

---

**Präzision – ein erreichbares Kriterium in der  
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie von Proteinen und der  
Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse von Metallen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
Dissertation

von Sandra Grotefend  
aus Peine

---

---

1. Referent:	Professor Dr. Hermann Wätzig
2. Referent:	Professor Dr. Ingo Ott
eingereicht am:	21.08.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am:	10.12.2013

Druckjahr 2014

---

---

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

Meyer, A., Grotefend, S., Gross, A., Wätzig, H., Ott, I.: Total reflection X-ray fluorescence spectrometry as a tool for the quantification of gold and platinum metallodrugs: determination of recovery rates and precision in the ppb concentration range  
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 70: 713-717 (2012)

Grotefend, S., Kaminski, L., Wroblewitz, S., El Deeb, S., Kühn, N., Reichl, S., Limberger, M., Watt, S., Wätzig, H.: Protein Quantitation using various Modes of High Performance Liquid Chromatography  
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 71: 127-138 (2012)

### Tagungsbeiträge

Grotefend S., Kaminski L., Wätzig H.: Quantification of proteins using High Performance Size Exclusion and Strong Anion Exchange Chromatography (Poster)  
Drug Analysis 2010 - International Symposium on Drug Analysis, Antwerpen (2010)

Grotefend S., Kaminski L., Wätzig H.: High Performance Size Exclusion and Strong Anion Exchange Chromatography for Protein Assays (Poster)  
Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2010, Braunschweig (2010)

Grotefend, S., Kaminski, L., Wroblewitz, S., El Deeb, S., Limberger, M., Watt, S., Wätzig, H.: Application of various Modes of High Performance Liquid Chromatography for Protein Analysis (Vortrag)  
36<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques 2011, Budapest (2011)

---

Grotefend, S., Kaminski, L., Wroblewitz, S., El Deeb, S., Limberger, M., Watt, S., Wätzig, H.: Proteinquantifizierung mit Hilfe verschiedener Trennmechanismen der HPLC (Vortrag)  
Jahrestagung der Fachgruppe Arzneimittelkontrolle und Pharmazeutische Analytik 2011, Innsbruck (2011)

Grotefend, S., Kaminski, L., Wroblewitz, S., Wätzig, H.: Protein and Monoclonal Antibody Analysis using various Modes of High Performance Liquid Chromatography (Poster)  
Jahrestagung der Österreichischen und deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (ÖPHG & DPHG) 2011, Innsbruck (2011)

Rakow, T., Grotefend, S., Kaminski, L., Wätzig, H.: Using High Performance Size Exclusion Chromatography to investigate the Role of Sample Pretreatment in Protein Analysis (Poster)  
Jahrestagung der Österreichischen und deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (ÖPHG & DPHG) 2011, Innsbruck (2011)

Grotefend, S., Kaminski, L., Wroblewitz, S., Wätzig, H.: Quantification of Proteins and Protein aggregates using various Modes of High Performance Liquid Chromatography (Poster)  
“Immunogenicity and aggregation of therapeutic proteins” - Konferenz der Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V. (APV), Berlin (2011)

Grotefend, S., Wätzig, H.: Monoclonal antibody analysis using various modes of High Performance Liquid Chromatography (Poster)  
29<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography 2012, Torun (2012)

Grotefend, S., Wätzig, H.: Various Modes of High Performance Liquid Chromatography for Analysis of Monoclonal Antibodies (Poster)  
Jahrestagung der deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPHG) 2012, Greifswald (2012)

---

## Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meinem Mentor Professor Dr. Hermann Wätzig bedanken, unter dessen Leitung diese Arbeit entstanden ist. Vor allem danke ich für die Möglichkeit der Mitgestaltung des Themas und die Freiheiten bei der Erarbeitung, sowie den Besuch verschiedener nationaler und internationaler Tagungen.

Für die Übernahme des Koreferates möchte ich Herrn Professor Dr. Ingo Ott meinen herzlichen Dank aussprechen. Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. Ludger Beerhues für die Übernahme der Leitung der Prüfungskommission.

Ein weiterer großer Dank geht an die derzeitigen und ehemaligen Mitglieder unseres Arbeitskreises Dr. Lukas Kaminski, Sascha Kühne, Dr. Xi Deng, Dr. Heidi Köppel, Claudia Cianciulli, Sabine Redweik, Thomas Hahne, Tobias Rakow, Markus Nachbar und Hassan Al-Hazmi – die Zusammenarbeit mit euch war toll. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Lukas Kaminski für die Einarbeitung, sowie die Unterstützung bei sämtlichen Geräteproblemen und Fragen bedanken. Meiner ehemaligen Diplomandin Stefanie Wroblewitz danke ich für die optimale Zusammenarbeit und ihre Mitarbeit an meinem Thema, was mich sehr unterstützt hat. Darüber hinaus danke ich ihr für das fleißige Korrekturlesen. Tobias Rakow, Thomas Hahne und Sabine Redweik möchte ich an dieser Stelle ebenfalls für ihre Korrekturen und Verbesserungsvorschläge danken.

Für die gute Zusammenarbeit in dem TXRF-Projekt der „TXRF-Freaks, -Begeisterten, -Protagonisten oder -Freunde“ und die darin inbegriffenen unzähligen Diskussionen möchte ich Andreas Meyer, Prof. Dr. Hermann Wätzig, Prof. Dr. Ingo Ott und Dr. Armin Gross herzlich danken. Darüber hinaus danke ich der Bruker Nano GmbH, welche durch den Verleih des Picofox-Gerätes dieses Projekt erst ermöglicht hat.

Für die gute Zusammenarbeit bei der Praktikumsbetreuung des 4. Semesters möchte ich mich bei Dr. Hans-Otto Burmeister, Petra Reich, Sandra Meyer, Brigitte Babic, Dr. Stefanie Ludewig, Dr. Lukas Kaminski, Birte Straßdat, Thomas Hahne, Christian Kölln, Tobias Rakow und Andreas Arnold bedanken. „HOB, dir danke ich besonders für dein offenes Ohr und die Gestaltungsmöglichkeit während meiner Zeit am Institut, sowie für viele Weisheiten und Sprichwörter: Woher wüssten wir sonst, dass du nachts nicht auf dem Baum schläfst?“

Ein weiterer Dank geht an alle regelmäßigen und unregelmäßigen Teilnehmer der Neubaukaffeerunde – nicht ohne Grund haben wir so viele Stunden in diesem Raum verbracht und unseren Ruf als die wohl fleißigsten Kuchenesser erarbeitet...

Sabine Redweik, Daphny Kaminski und Claudia Cianciulli danke ich für die schöne Zeit, die wir neben der Arbeit noch miteinander verbracht haben. Die Tagungen waren doch immer wieder ein Erlebnis – und wenn es nur um die Wahl des richtigen Outfits ging.

Für die technische Unterstützung bei der Reparatur der HPLC-Geräte möchte ich mich bei Brigitte Babic bedanken. Frank Roeser danke ich für die unzähligen, teilweise unkonventionellen, Lösungen in der Geräte-Reparatur und darüber hinaus unsagbar lustige Gespräche. Dr. Lutz Preu danke ich für die Unterstützung und Lösungsfindung bei HPLC-Problemen, wobei ich sehr von seiner Erfahrung profitieren durfte. Für die Unterstützung bei sämtlichen PC-Problemen danke ich Klaus Hartmann und Matthias Söchtig.

---

Den Kooperationspartnern des HPLC-Projektes, der PHAST GmbH mit Andreas Ziegler und Dr. Markus Limberger und der A&M STABTEST GmbH mit Dr. Steven Watt, möchte ich an dieser Stelle für die Einsicht und Verwendung ihrer Daten danken.

Auch möchte ich mich bei meinen Wahlpflichtmädels Beril Sayar und Narges Nader bedanken, die mich bei der Entwicklung der Methode zur Antikörperanalyse mit ihren Ideen und ihrem Arbeitseinsatz sehr unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an Svenja Schlordt, die mich immer wieder ermutigt hat und den Glauben in mich nie verloren hat, auch wenn alles schief zu laufen schien. „Danke, dass du immer für mich da bist!“

Bei meinen Unimädels Elena Regner, Annette Lader, Mona Hagedorn und Julia Schur möchte ich mich für die tolle Zeit während und auch nach dem Studium bedanken – auf das es noch viele Jahre so bleibt!

Ein weiteres großes Dankeschön geht an meine Apotheken-Chefin Frau Dr. Barbara Dierich und den „Rest“ des Apothekenteams, die es mir während der gesamten Promotion durch ihre Flexibilität ermöglicht haben den Bezug zur Apothekenpraxis nicht zu verlieren und mich auch auf diesem Gebiet weiter zu entwickeln.

Ganz zum Schluss, aber sicher nicht an letzter Stelle möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: „Danke, dass ihr mich während der ganzen Zeit unterstützt und ermutigt habt und nicht den Glauben in mich verloren habt! Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle auch für die Finanzierung und die Unterstützung während meines Studiums, sowie für das fleißige Korrekturlesen bedanken. Christoph, dir danke ich ganz besonders für das Ertragen meiner Launen und den fortwährenden Versuch meinen Erklärungen zu folgen, auch wenn es oftmals sicher nicht interessant war...und darüber hinaus dafür, dass du mir neben unserem anderen Projekt noch Zeit gelassen hast, meine Arbeit fertig zu stellen.“

---

***für meine Familie***

---

„Ja, man muss seinen Traum finden,  
dann wird der Weg leicht. Aber es gibt  
keinen immerwährenden Traum, jeden  
löst ein neuer ab, und keinen darf man  
festhalten wollen.“

*Hermann Hesse*



## Inhaltsverzeichnis

<b>Vorveröffentlichungen der Dissertation .....</b>	<b>i</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>iii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>vii</b>
<b>Symbole .....</b>	<b>xii</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>xv</b>
<b>1 Einleitung und Aufgabenstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Teil.....</b>	<b>4</b>
2.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	4
2.1.1 Aufbau und Prinzip der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	4
2.1.1.1 Elutionsmittel.....	5
2.1.1.2 Gradientenmischer.....	6
2.1.1.3 Pumpe .....	6
2.1.1.4 Injektor.....	7
2.1.1.5 Trennsäule .....	7
2.1.1.6 Detektor.....	8
2.1.1.7 Software/Datenauswertung .....	10
2.1.2 Trennmechanismen.....	10
2.1.2.1 Normal- und Umkehrphasenchromatographie .....	11
2.1.2.2 Größenausschlusschromatographie.....	11
2.1.2.3 Ionenaustauschchromatographie .....	13
2.2 Chromatographische Parameter nach dem Europäischen Arzneibuch .....	14
2.2.1 Massenverteilungsverhältnis.....	15
2.2.2 Plattenzahl.....	16
2.2.3 Symmetriefaktor .....	17
2.2.4 Auflösung.....	18
2.2.5 Peak-Tal-Verhältnis.....	18
2.2.6 Signal-Rausch-Verhältnis.....	19
2.3 Proteine .....	20
2.3.1 Aufbau und Struktur .....	20
2.3.2 Modellproteine .....	22
2.3.3 Immunglobuline .....	22
2.3.3.1 Monoklonale Antikörper .....	23

2.4	Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) .....	24
2.4.1	Aufbau und Prinzip eines TXRF-Systems .....	25
2.4.1.1	Entstehung der Röntgenfluoreszenz .....	26
2.4.1.2	Grundlagen der Totalreflexion .....	27
2.4.1.3	Röntgenstrahler.....	28
2.4.1.4	Probenträger .....	29
2.4.1.5	Detektor.....	30
2.4.1.6	Quantifizierung mit TXRF .....	30
2.4.1.7	Interne Standardisierung .....	31
2.5	Parameter zur Methodenvvalidierung nach ICH Q2(R1) .....	31
2.5.1	Spezifität - Selektivität .....	31
2.5.2	Linearität .....	32
2.5.3	Arbeitsbereich .....	32
2.5.4	Richtigkeit .....	32
2.5.5	Präzision .....	33
2.5.6	Nachweisgrenze.....	35
2.5.7	Bestimmungsgrenze.....	35
2.5.8	Robustheit .....	36
<b>3</b>	<b>Proteinquantifizierung mit Hilfe der HPLC .....</b>	<b>37</b>
3.1	Anionenaustauschromatographie .....	38
3.1.1	Methodenentwicklung Modellproteine .....	38
3.1.2	Myoglobin und $\beta$ -Casein .....	39
3.1.2.1	Präzision der SAX-Trennung von Myoglobin und $\beta$ -Casein .....	39
3.1.3	Myoglobin, Ovalbumin und Bovines Serum Albumin .....	39
3.1.3.1	Präzision der SAX-Trennung von Myoglobin, Ovalbumin und BSA .....	42
3.1.3.2	Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	43
3.1.4	Methodenentwicklung Antikörper .....	44
3.2	Größenausschlusschromatographie (SEC).....	48
3.2.1	Idealer Modus.....	49
3.2.2	Nicht-Idealer Modus .....	50
3.2.2.1	Präzision der SEC-Trennung von Myoglobin und Ovalbumin .....	52
3.2.3	Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen zur Proteinprobe.....	53
3.2.3.1	Brij 35 .....	54
3.2.3.2	Natriumlaurylsulfat .....	55
3.2.4	Vergleichsdaten aus der Industrie .....	56

3.2.4.1	Größenausschlusschromatographie.....	56
3.2.4.2	Umkehrphasenchromatographie .....	58
3.2.5	Methodenentwicklung monoklonaler Antikörper.....	59
3.2.5.1	Größenbestimmung des monoklonalen Antikörpers .....	60
3.2.5.2	Präzision der SEC-Trennung des monoklonalen Antikörpers .....	61
3.3	Kationenaustauschchromatographie .....	62
3.3.1	Methodenentwicklung Modellproteine .....	62
3.3.2	Myoglobin und Ovalbumin und Bovines Serum Albumin .....	62
3.3.3	Myoglobin, Ovalbumin.....	66
3.3.4	Ovalbumin, Cytochrom C und Lysozym .....	67
3.3.4.1	Präzision der WCX-Trennung von Ovalbumin, Lysozym, Cytochrom C ...	68
3.3.5	Methodenentwicklung Antikörper.....	69
3.3.5.1	Phosphatpuffer.....	70
3.3.5.2	MES-Puffer.....	74
3.3.5.3	Warum gibt der Antikörper 3 Peaks?.....	78
3.3.5.4	Zusatz von Carboxypeptidase B.....	80
3.3.5.5	Relevanz der Heterogenität von Antikörpern .....	82
3.3.5.6	Präzision der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers .....	83
3.4	Vergleich der Trennmodi und –techniken.....	86
3.4.1	Modellproteine .....	86
3.4.1.1	Gemeinsamkeiten .....	88
3.4.1.2	Unterschiede .....	88
3.4.1.3	Bewertung .....	91
3.4.2	Monoklonaler Antikörper .....	93
3.4.2.1	Gemeinsamkeiten und Unterschiede .....	93
3.4.2.2	Bewertung .....	95
3.4.3	Modellproteine und monoklonaler Antikörper .....	96
3.4.4	HPLC vs. Elektrophorese.....	97
<b>4</b>	<b>Präzision in der Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse .....</b>	<b>100</b>
4.1	Bestimmung von Gold in Auranofin .....	100
4.1.1	Bestimmung von Wiederfindungsrate und S/N.....	101
4.1.2	Einfluss verschiedener Parameter auf die Präzision.....	101
4.1.2.1	Einfluss der Analysenzeit auf S/N und Präzision .....	102
4.2	Bestimmung von Gold aus einer Gold-Standardlösung.....	105
4.2.1	Vergleich Messungen mit und ohne PVA-Zugabe .....	105

4.2.1.1	Präzision.....	107
4.2.1.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	109
4.3	Bewertung.....	110
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>115</b>
6.1	Instrumentierung und Software.....	115
6.1.1	HPLC-Geräte.....	115
6.1.1.1	MERCK® Hitachi®.....	115
6.1.1.2	VWR-Hitachi®.....	115
6.1.2	Eingesetzte HPLC-Trennsäulen.....	116
6.1.2.1	Anionenaustauschchromatographie.....	116
6.1.2.2	Größenausschlusschromatographie.....	116
6.1.2.3	Kationenaustauschchromatographie.....	116
6.1.3	TXRF-Gerät.....	116
6.1.3.1	Probenträger.....	117
6.1.4	Weitere Geräte und Materialien.....	117
6.1.5	Auswertung der Messdaten.....	118
6.2	Reagenzien und Chemikalien.....	118
6.3	Probenvorbereitung.....	119
6.3.1	Proteinprobenvorbereitung für die HPLC-Messungen.....	119
6.3.2	Vorbereitung von Proben mit monoklonalem Antikörper für die HPLC.....	120
6.3.3	Vorbereitung der Antikörperproben mit Carboxypeptidase B-Zusatz.....	120
6.3.4	Vorbereitung der Probenträger für die TXRF-Messungen.....	120
6.3.5	Auranofin-Probenvorbereitung für die TXRF-Messungen.....	121
6.3.6	Verdünnung der Goldstandardlösung für TXRF-Messungen.....	121
6.4	Methoden.....	121
6.4.1	SAX.....	121
6.4.1.1	Myoglobin, $\beta$ -Casein.....	121
6.4.1.2	Myoglobin, Ovalbumin, BSA.....	122
6.4.1.3	Monoklonaler Antikörper.....	122
6.4.2	SEC.....	123
6.4.2.1	Ideale SEC.....	123
6.4.2.2	Nicht-Ideale SEC.....	123
6.4.2.3	Brij- und SDS-Zusatz.....	123
6.4.2.4	Monoklonaler Antikörper.....	123

6.4.3	WCX .....	124
6.4.3.1	Myoglobin, Ovalbumin, BSA .....	124
6.4.3.2	Myoglobin und Ovalbumin .....	125
6.4.3.3	Ovalbumin, Cytochrom C, Lysozym .....	125
6.4.3.4	Monoklonaler Antikörper .....	125
6.4.3.5	Monoklonaler Antikörper mit Carboxypeptidase B .....	127
6.4.4	TXRF .....	127
6.4.4.1	Auranofin – Bestimmung von Wiederfindungsrate und Signal/Rausch- Verhältnissen.....	127
6.4.4.2	Auranofin – Einfluss von Probenvorbereitung und Zeit auf die Präzision	127
6.4.4.3	Gold-Standardlösung – Präzision mit und ohne Zugabe von Polyvinylalkohol.....	128
6.4.4.4	Gold-Standardlösung – Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	128
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>134</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>156</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>162</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>164</b>

## Symbole

$A$	- Absorption - in der van-Deemter-Gleichung: Eddy-Diffusion
Ar	- Argon
$A_s$	- Peaksymmetrie
Au	- Gold
$\alpha$	- Irrtumswahrscheinlichkeit
$\alpha_{crit}$	- kritischer Winkel
$\alpha_m$	- Einfallswinkel und Reflektion der Röntgenstrahlung
$b$	- Schichtdicke
Ba	- Barium
Br	- Brom
$B/u$	- in der van-Deemter-Gleichung: Längsdiffusion
$c$	- molare Konzentration
Ca	- Calcium
$c_{is}$	- Konzentration des internen Standards
Cl	- Chlor
Cr	- Chrom
Cu	- Kupfer
$c_x$	- Konzentration des vermessenen Elementes
$C \cdot u$	- in der van-Deemter-Gleichung: Massenübergang
$d$	- HPLC: Entfernung in einem Zwanzigstel der Peakhöhe gemessen vom aufsteigenden Kurvenast zum Lot durch das Peakmaximum - XRF: Abstand zweier Schichten des Multilayers
$D_m$	- Massenverteilungsverhältnis
$\varepsilon$	- molarer Absorptionskoeffizient
$f$	- Anzahl der Freiheitsgrade
Fe	- Eisen
$h$	- Bereich des Rauschens in einem Chromatogramm betrachtet auf einer Distanz der min. 5-fachen Peakhalbwertsbreite

---

$H$	- Höhe des betrachteten Peaks, gemessen vom Peakmaximum bis zur extrapolierten Basislinie - bei Betrachtung der Anzahl der theoretischen Böden auch Trennstufenhöhe
$H/2$	- halbe Peakhöhe
$H_p$	- Höhe des kleineren Peaks über der extrapolierten Basislinie
$H_v$	- Höhe des niedrigsten Punktes der Kurve zwischen dem größeren und dem kleineren Peak über der extrapolierten Basislinie
K	- Kalium
$k$	- Retentionsfaktor
$k'$	- Kapazitätsfaktor
$K_D$	- Verteilungskoeffizient
$L$	- Säulenlänge
$\lambda$	- Wellenlänge
$m$	- beliebige ganze Zahl
Mn	- Mangan
Mo	- Molybdän
$\mu$	- richtiger Wert (Sollwert)
$n$	- Brechungsindex
$n$	- Anzahl der Bestimmungen
$N$	- Trennstufenzahl/Zahl der theoretischen Böden
Ni	- Nickel
$N_{is}$	- Nettointensität des internen Standards
$N_x$	- Nettointensität des Analyten
P	- Phosphor
$p/v$	- Peak-Tal-Verhältnis
pH	- negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
pl	- isoelektrischer Punkt
Rb	- Rubidium
$R_s$	- Auflösung

---

$RSD \%$	- relative Standardabweichung ausgedrückt in Prozent (Relative Standard Deviation [%])
$RSD \%_{pooled}$	- gepoolte relative Standardabweichung ausgedrückt in Prozent
$s$ bzw. $\sigma$	- absolute Standardabweichung
S	- Schwefel
S	- Steigung der Kalibrierfunktion
$\hat{\sigma}$	- Standardabweichung einer Stichprobe
$S/N$	- Signal-Rausch-Verhältnis
Si	- Silizium
$S_{is}$	- relative Intensität des internen Standards
$S_x$	- relative Intensität des Analyten
Ti	- Titan
$t_M$	- Totzeit
$t_R$	- Retentionszeit
$u$	- in der van-Deemter-Gleichung: Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase
$V_E$ bzw. $V_R$	- Elutionsvolumen des betrachteten Peaks
$V_t$ bzw. $V_M$	- Totvolumen
$V_0$	- Ausschlussvolumen
$w_{0,05}$	- Peakbreite in einem Zwanzigstel der Peakhöhe
WFR %	- Wiederfindungsrate ausgedrückt in Prozent
$w_h$	- Peakhalbwertsbreite
$\bar{x}$	- Mittelwert der Einzelmesswerte
$x_i$	- Einzelwerte der Bestimmungen
Y	- Yttrium
Zn	- Zink



## Abkürzungen

2-DE	- zweidimensionale Gelelektrophorese
AAS	- Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	- Abbildung
AC	- Affinitätschromatographie (Affinity Chromatography)
AEC	- Anionenaustauschchromatographie (Anion Exchange Chromatography)
AES	- Atomemissionsspektrometrie
API	- wirksamer Bestandteil eines Arzneimittels (Active Pharmaceutical Ingredient)
AU	- Absorptionseinheit(en) (Absorption unit(s))
APV	- Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik
BSA	- Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bzw.	- beziehungsweise
CE	- Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis)
CEC	- Kationenaustauschchromatographie (Cation Exchange Chromatography)
CIEF	- Kapillarisoelektrische Fokussierung (Capillary Isoelectric Focusing)
CGE	- Kapillargelelektrophorese (Capillary Gel Electrophoresis)
CME	- Cellulosemischester
cps	- Zählsschritte pro Sekunde (counts per seconds)
CZE	- Kapillarzonenelektrophorese (Capillary Zone Electrophoresis)
Da	- Dalton
DAD	- Diodenarray Detektor (Diode Array Detector)
DPhG	- Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft

eV	- Elektronenvolt
FLD	- Fluoreszenz-Detektor
GFC	- Gelfiltrationschromatographie (Gel Filtration Chromatography)
ggf.	- gegebenenfalls
GPC	- Gelpermeationschromatographie (Gel Permeation Chromatography)
HCl	- Salzsäure
HETP	- Höhenequivalent eines theoretischen Bodens (Height Equivalent to one Theoretical Plate)
HIC	- Hydrophobe Interaktionschromatographie (Hydrophobic Interaction Chromatography)
HILIC	- Hydrophile Interaktionschromatographie (Hydrophilic Interaction Chromatography)
HPLC	- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
Hz	- Hertz
ICH	- Internationale Konferenz für die Harmonisierung von technischen Anforderungen für die Registrierung von Arzneimitteln für den Gebrauch am Menschen (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
ICP-AES	- Induktiv-gekoppeltes Plasma mit Atomemissionsspektrometrie
ICP-MS	- Induktiv-gekoppeltes Plasma mit Massenspektrometrie
IEF	- Isoelektrische Fokussierung
IEP bzw. pI	- Isoelektrischer Punkt
IEX	- Ionenaustauschchromatographie (Ion Exchange Chromatography)
IUPAC	- Internationale Union für reine und angewandte Chemie (International Union of Pure and Applied Chemistry)
kDa	- Kilodalton
keV	- Kiloelektronenvolt
kV	- Kilovolt
LC	- Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography)

---

LC-MS	- Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)
LOD	- Detektionsgrenze (Limit of Detection)
LOQ	- Bestimmungsgrenze (Limit of Quantitation)
lt.	- laut
mAb	- monoklonaler Antikörper (monoclonal Antibody)
MES	- 2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	- Minuten
mM	- milli molar
M	- molar
NaCl	- Natriumchlorid/Kochsalz
nSEC	- nicht-ideale Größenausschlusschromatographie (non-ideal Size Exclusion Chromatography)
ÖPhG	- Österreichische Pharmazeutische Gesellschaft
Phe	- Säule BioSep™ s-3000, Phenomenex
Ph. Eur.	- Europäisches Arzneibuch (Pharmacopoeia Europaea)
ppb	- Teile pro Milliarde (parts per billion)
ppm	- Teile pro Million (parts per million)
PSS	- Säule Proteema 300 Å, 5 µm, PSS
PVA	- Polyvinylalkohol
PVDF	- Polyvinylidenfluorid
rel.	- relativ(e)
RP	- Umkehrphase/Umkehrphasenchromatographie (Reversed Phase)
S/N	- Signal-Rausch-Verhältnis (Signal to Noise ratio)

SAX	- starker Anionenaustauscher/starke Anionenaustauschchromatographie (Strong Anion Exchange Chromatography)
SCX	- starker Kationenaustauscher/starke Kationenaustauschchromatographie (Strong Cation Exchange Chromatography)
SDD	- Silizium-Drift-Detektor
SDS	- Natriumlaurylsulfat/Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	- Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	- Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography)
sec	- Sekunden
Tab.	- Tabelle
TNF	- Tumornekrosefaktor
Tris	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TXRF bzw. TRFA	- Totalreflektionsröntgenfluoreszenzspektrometrie/-analyse (Total reflection X-ray fluorescence)
UV/VIS	- Ultra Violett/Visible (Ultraviolett/sichtbar)
WAX	- schwacher Anionenaustauscher/schwache Anionenaustauschchromatographie (Weak Anion Exchange Chromatography)
WCX	- schwacher Kationenaustauscher/schwache Kationenaustauschchromatographie (Weak Cation Exchange Chromatography)
WELAC	- Westeuropäische Laborakkreditierungscooperation (Western European Laboratory Accreditation Cooperation)
XRF bzw. XRFS	- Röntgenfluoreszenzanalyse, Röntgenfluoreszenzspektrometrie (X-ray Fluorescence Analysis)
z.B.	- zum Beispiel

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Als in der Mitte des 18. Jahrhunderts die ersten Versuche zur Trennung von Pflanzenpigmenten durchgeführt wurden, konnte wohl kaum jemand die spätere Entwicklung und die Reichweite der auf diese Weise entstandenen Technik erahnen. Touchstone [1] stellt entgegen allgemeiner Annahmen F. Goppelsroeder und C. F. Schonbein mit ihren schon 1861 durchgeführten Substanztrennungen auf Filterpapier als die „echten“ Entdecker der Chromatographie (Wortbedeutung: Farbenschreiben) vor. Üblicherweise wird jedoch dem russischen Botaniker Michael S. Tswett die Erfindung der chromatographischen Trennungen mit seinen Beobachtungen der Adsorptionsphänomene zur Trennung von Pflanzenpigmenten zugeschrieben [2]. Ettre und Sakodynskii legen sich hierbei jedoch nicht auf ein bestimmtes Jahr fest, sondern sehen diese Untersuchungen als Resultat seiner wissenschaftlichen Entwicklung, wobei die Grundlagen schon mit seiner russischen Masterarbeit gelegt worden seien [2]. Für ihre Arbeit zur Chromatographie mit zwei flüssigen Phasen [3] wurden Archer J. P. Martin und Richard L. M. Synge 1952 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [2]. Die Weiterentwicklung zu der heute als Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography, HPLC) bekannten Technik ist laut Touchstone [1] vor allem J. J. Kirkland, J. F. K. Huber und C. Horvath zu verdanken. Kirkland evaluierte neben seinen Arbeiten zur Gaschromatographie [4–6] den Einsatz des UV-Detektors in der Flüssigchromatographie [7]. Huber [8] und Horvath [9] hingegen beschäftigten sich mit den für die HPLC nötigen Trennsäulen. In den 1970-er Jahren wurde von Geräteherstellern begonnen die ersten kompletten HPLC-Systeme zu entwickeln und zu vertreiben [1].

Obwohl die HPLC schon lange die am häufigsten eingesetzte analytische Trenntechnik ist [10], wurde sie doch in den letzten Jahren immer weiter optimiert, um noch höhere Trennleistungen zu erhalten und noch kompliziertere Trennprobleme lösen zu können. Optimierungsansätze waren dabei der Einsatz von monolithischen Säulen [11], Säulen mit sehr kleinen Partikeldurchmessern ( $< 2\ \mu\text{m}$ ) [12,13] oder solche mit einem kleinen Partikel im Kern und einer umliegenden Hülle (engl.: core shell particles) [14], sowie die Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) [15]. Hierdurch sollten nicht nur höhere Trennleistungen erreicht werden, sondern auch noch kürzere Analysenzeiten. Dieser Anspruch konnte durch den Einsatz der UHPLC mit Sub-2  $\mu\text{m}$ -Säulen erfüllt werden, da eine große Zeitersparnis der UHPLC-Trennung gegenüber einer klassischen HPLC-Trennung erzielt werden kann [16].

In den letzten Jahren nahm der Anteil von proteinbasierten Arzneimitteln, sogenannten Biopharmazeutika oder Biologika (engl.: biologicals), am Markt deutlich zu [17] und auch in der Entwicklung wächst der Anteil dieser Arzneimittel stetig [18]. Hierbei handelt es sich häufig um monoklonale Antikörper (mAb), welche unter anderem zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder für die Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden [19–21]. Anders als bei chemischen Wirkstoffen ist bei diesen mAbs nicht nur das Produkt, sondern auch das Herstellungsverfahren strikt reglementiert [22]. Um eine gleichbleibende Arzneimittelqualität zu gewährleisten wird beides über die Qualitätskontrolle überprüft. Da Proteine im Gegensatz zu üblichen chemischen Wirkstoffen einen komplizierteren Aufbau und ein höheres Molekulargewicht besitzen [23] und darüber hinaus zur Aggregatbildung neigen [24,25], gestaltet sich deren Analytik deutlich schwieriger. Allerdings drängen immer mehr proteinbasierte Arzneimittel auf den Markt, sodass es essentiell wichtig ist über selektive und präzise Analysemethoden für diese Arzneimittel zu verfügen. Hierbei sind

insbesondere die „Biosimilars“ als neue Arzneimittelgruppe zu beachten. Dabei handelt es sich um dem Ausgangsarzneimittel ähnliche Arzneimittel, welche nach Auslaufen des Patentschutzes als molekulare Nachahmungen produziert werden und anders als Generika nur sehr ähnlich und nicht identisch sind [26]. Allerdings muss belegt werden, dass dieselbe Wirksamkeit des Ausgangsproduktes gegeben ist. Dieses wird durch eine analytische Vergleichbarkeitsstudie gegen ein Referenzprodukt sichergestellt [27], wobei auch die Arzneimittelqualität in Form von Reinheit und Gehalt gewährleistet sein muss. Für die nötige Quantifizierung sind klassische Analysemethoden wie die Dünnschicht- oder Gaschromatographie oder auch die UV/Vis-Spektrometrie häufig nicht geeignet. Auch die typischerweise für die Proteinanalyse verwendete Gelelektrophorese ist oft nicht einsetzbar, da sie zwar über eine hohe Selektivität aber eine für die Qualitätskontrolle ungenügende Präzision ( $> 2\%$  relative Standardabweichung [28]) verfügt [29], sodass eine Proteinquantifizierung hiermit nicht möglich ist. Da für die Quantifizierung laut Koller die Präzision und die Reproduzierbarkeit die wichtigsten Aspekte sind [28], müssen hier Alternativen gefunden werden. Inzwischen kommen relativ häufig Kopplungen von Flüssigchromatographie (engl.: liquid chromatography, LC) und Massenspektrometrie (engl.: mass spectrometry, MS) für die Proteinanalytik zum Einsatz [30,31]. Diese erfordern jedoch teures Equipment und eine aufwendige Probenvorbereitung. Die Verwendung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography, HPLC) als Teil einer Kopplung, zeigt jedoch schon deren mögliche Eignung für die Analytik von Proteinen.

Dieses war der Ausgangspunkt für das Hauptprojekt dieser Arbeit, bei dem gezeigt werden soll, dass mit der HPLC eine präzise und selektive Proteinanalytik möglich ist. Im Vordergrund steht hierbei die mögliche Proteinquantifizierung, welche mit unterschiedlichen Trennmechanismen der HPLC angestrebt wird. Hierbei kommt neben klassischen Trennsäulen der Kationenaustausch- und der Größenausschlusschromatographie auch eine monolithische stationäre Phase in Form eines Anionenaustauschers zum Einsatz. Nach der Methodenentwicklung in den einzelnen Trennmechanismen zur Trennung von Modellproteinen und eines monoklonalen Antikörpers, wird die Präzision überprüft und ein Vergleich durchgeführt. Dabei werden zunächst die eingesetzten Methoden untereinander verglichen und daran anschließend ein Vergleich mit elektrophoretischen Techniken durchgeführt, da diese auch häufig für die Proteinanalyse eingesetzt werden. Es soll hiermit gezeigt werden, dass die HPLC mit ihren unterschiedlichen Trennmechanismen eine gute Möglichkeit der Proteinquantifizierung bietet und die entwickelten Methoden neben einer hohen Präzision auch über eine ausreichende Selektivität verfügen. Hierbei wurde eine möglichst generelle Aussage angestrebt, welche Trennmechanismen der HPLC sich am besten für die Proteinanalytik eignen. Die Neuerungen der HPLC wurden bei diesem Ansatz bisher nicht berücksichtigt, da die klassische HPLC im Gegensatz zur UHPLC nahezu in jedem Labor verfügbar ist.

Die Präzision spielt nicht nur für die Proteinquantifizierung im Rahmen der Qualitätskontrolle eine Rolle. Auch bei der Bestimmung von Metallen ist dies ein wichtiger Aspekt. Neben den altbewährten Antirheumatika, die Gold enthalten [32], werden für die Behandlung unterschiedlichster Krebsarten vermehrt metallbasierte Zytostatika entwickelt [33,34]. Aufgrund der nicht in Frage zu stellenden Toxizität letzterer ist hier eine präzise Analysemöglichkeit gefragt. Diese Notwendigkeit der genauen Analyse von Metallen in Metallkatalysatoren oder Metallreagenzien wurde auch von der Kommission des Europäischen Arzneibuches festgestellt, weshalb ein Arbeitsentwurf einer zugehörigen

Monographie mit dem Titel: „Metal catalysts or metal reagents: procedures“ (deutsch: Metallkatalysatoren und Metallreagenzien: Verfahren) existiert [35]. Darin sind mögliche Analysetechniken wie beispielsweise die Atomabsorptions- und die Atomemissionspektrometrie oder auch die Röntgenfluoreszenzspektrometrie mit den zu erfüllenden Spezifikationen genannt. Eine nicht explizit genannte Technik ist die Totalreflexionsröntgenfluoreszenzspektrometrie bzw. -analyse (engl.: Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis, TXRF), welche seit den 1970-er Jahren für die quantitative Elementanalyse eingesetzt wird [36].

Bei der Totalreflexionsröntgenfluoreszenzspektrometrie handelt es sich um eine Sonderform der Röntgenfluoreszenzspektrometrie (engl.: X-ray Fluorescence Spectrometry/Analysis, XRF oder XRFS). Nachdem von W.C. Röntgen 1895 die Röntgenstrahlung entdeckt wurde [37] und die ersten Experimente zur Brechung von Röntgenstrahlen an einem Prisma durchgeführt wurden, wurde die zugehörige Theorie von W. Stenström 1919 nachgeliefert [38]. Der Beweis über die Existenz der Totalreflexion wurde im Jahr 1922 von A. Compton erbracht [38]. Die Entwicklung der Totalreflexionsröntgenfluoreszenzspektrometrie wie sie heute bekannt ist, wurde allerdings erst wesentlich später durch Y. Yoneda und T. Horiuchi [39] mit ihren gleichzeitigen Bestimmungen kleiner Mengen unterschiedlicher Elemente (Zink, Chrom, Eisen, Nickel) und H. Aiginger und P. Wobrauschek [36] mit ihren Messungen im Nanogrammbereich vorangetrieben [38,40,41]. Das erste kommerziell erhältliche TXRF-Gerät wurde 1980 produziert [41].

Gegenüber der üblichen Röntgenfluoreszenzspektrometrie besitzt die Technik mit Totalreflexion den Vorteil, dass durch den Geräteaufbau die Probe zweimal angeregt wird, was zu einer sehr hohen Empfindlichkeit führt [42]. Dadurch eignet sich die TXRF zur Bestimmung sehr geringer Substanzmengen [42]. Ein weiterer Vorteil ist die sehr einfache Probenvorbereitung, da keine Matrixabhängigkeit besteht und aus diesem Grund keine Isolierung der zu untersuchenden Bestandteile aus biologischen Proben erfolgen muss [43,44]. Von Polgari [45] und Borgese [46] wurde gezeigt, dass dieses auch für die Bestimmung von Metallen aus biologischen Proben gilt. Auf Grund der genannten Vorteile lag der Einsatz dieser Technik zur Metall-Bestimmung nahe. Hierbei sollte die Eignung für den Monographieentwurf, am Beispiel von Gold, bewiesen werden. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag dabei auf der Bestimmung der Präzision (Forderung: 20-25 % relative Standardabweichung [35]) und der Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Dafür wurden das Antirheumatikum Auranofin, welches gebundenes Gold enthält, und eine Gold-Standardlösung als Analyten verwendet.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Als Form der Säulenchromatographie wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie als ein analytisches Trennverfahren um 1969 von Kirkland, Huber und Horvarth [1] entwickelt. Im Gegensatz zur konventionellen Säulenchromatographie, bei der das Elutionsmittel (mobile Phase) durch die mit Trennmateriale gefüllte senkrecht stehende Säule nur durch den hydrostatischen Druck fließt, kommt in der HPLC eine Pumpe zum Einsatz, welche die mobile Phase mit relativ hohen Drücken durch das System befördert. Das funktionelle Element ist dabei die Trennsäule, welche auch als stationäre Phase bezeichnet wird, an der die eigentliche Separation der Probe erfolgt. Auf Grund des Einsatzes hoher Drücke, wurde die HPLC auch häufig als Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography) bezeichnet. Da die eigentliche chromatographische Trennung aber nicht durch den Druck bedingt ist, sollte diese Bezeichnung nicht mehr verwendet werden [10]. Der Grund für die heutige Bezeichnung als Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist die wesentlich höhere Trennleistung im Vergleich zur Säulenchromatographie – es können deutlich mehr Substanzen in kurzer Zeit getrennt werden, als dies zuvor möglich war. Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der HPLC ergeben sich dadurch, dass Trennsäulen mit unterschiedlichen Trennprinzipien und verschiedenen Elutionsmitteln verwendet werden können, sodass sehr viele Trennprobleme gelöst werden können. Dies hat laut Rücker et al. [10] dazu geführt, dass die HPLC heute die meistangewandte Trenntechnik in der pharmazeutischen Analytik ist.

#### 2.1.1 Aufbau und Prinzip der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Ein HPLC-Gerät kann trotz gleicher Funktionsweise sehr unterschiedlich aussehen. Abb. 2-1 zeigt die während dieser Arbeit verwendeten Instrumente. Obwohl diese beiden Geräte auf den ersten Blick recht ungleich wirken, enthalten sie doch die gleichen Grundelemente (Module), die im Folgenden noch näher erläutert werden.



**Abb. 2-1** verwendete HPLC-Geräte; links: MERCK® Hitachi® HPLC-Anlage, rechts: VWR-Hitachi® HPLC-Anlage

Da auf den Fotos in Abb. 2-1 nur das Äußere der HPLC-Geräte erkennbar ist und das „Innenleben“ verborgen bleibt, ist der schematische Aufbau eines solchen Systems zur Verdeutlichung in Abb. 2-2 dargestellt. Die Bezeichnungen der einzelnen Elemente mit der Bezifferung finden sich mit näherer Erläuterung in den nächsten Abschnitten.



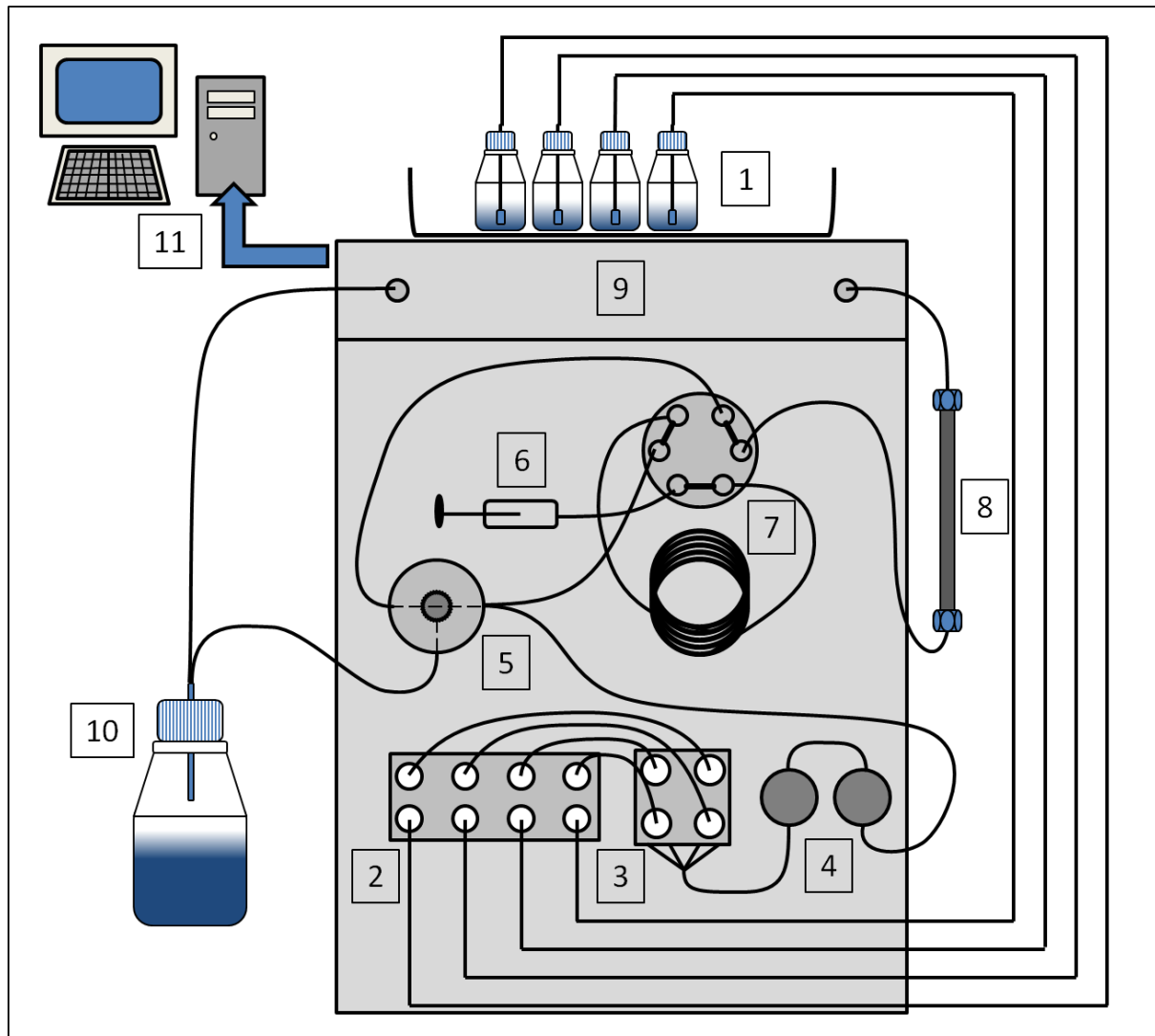


Abb. 2-2 schematischer HPLC-Aufbau; 1) Elutionsmittel, 2) integrierter Entgaser, 3) Gradientenmischer, 4) Pumpe, 5) Spülventil, 6) Injektor, 7) Dosierschleife, 8) Trennsäule, 9) Detektor, 10) Abfallgefäß, 11) PC mit Datenauswertung; erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup>

### 2.1.1.1 Elutionsmittel

Das Elutionsmittel, welches oft auch als Fließmittel, Eluent oder mobile Phase bezeichnet wird, ist für den eigentlichen Transport der zu analysierenden Probe durch das System verantwortlich (Abb. 2-2, Ziffer 1). Es wird mit Hilfe der Pumpe durch alle Komponenten des HPLC-Systems transportiert. Nötig ist der Einsatz sehr reiner Fließmittel (Bezeichnung: HPLC-Grade), damit es während der Analyse nicht zu Störsignalen am Detektor (siehe Abschnitt 2.1.1.6) durch die Elutionsmittel kommt. Um eine Gefährdung der Analysen und des Systems durch Verunreinigungen oder Schwebstoffe zu vermeiden, wird das Elutionsmittel durch eine engporige Fritte filtriert [47]. Die Aufbewahrung der Fließmittel erfolgt normalerweise in Glasflaschen, welche idealerweise mit speziellen Sicherheitsventilen dicht verschlossen sind [48]. Einerseits zum eigenen Schutz, da verwendete Fließmittel oft beim Ausgasen gesundheitsschädlich sein können und andererseits, da sich durch diesen Prozess auch die Zusammensetzung des Fließmittels verändert und somit keine reproduzierbaren Ergebnisse mehr erhalten werden können. Dieses spielt bei Verwendung von Fließmitteln mit organischen Bestandteilen eine größere Rolle, da sie leichter flüchtig sind als vorwiegend Wässrige. Für die unterschiedlichen Trennmechanismen werden je nach

Elutionsprinzip verschiedene Anforderungen an die nötigen Fließmittel gestellt (vgl. Abschnitt 2.1.2). Allen gemein ist jedoch, dass die Probe im jeweiligen Fließmittel löslich sein muss.

Da gelöste Gase im Fließmittel zu Störungen durch Bildung von Gasblasen führen können, werden die Elutionsmittel vor der Verwendung entgast. Dieses wird meist mit Hilfe eines Ultraschallbades durchgeführt [47]. Bei neueren HPLC-Systemen wie bei dem hier verwendeten VWR-Hitachi®-Gerät ist häufig ein automatischer Entgaser (siehe Abb. 2-2, Ziffer 2) integriert. Dieser besteht aus einer synthetischen Membran aus Kunstharz durch die das Gas, welches sich im Fließmittel befindet, auf Grund seiner geringen molaren Masse und seiner Affinität zur Membran strömen kann. Das eigentliche Fließmittel durchdringt die Membran nicht und wird somit entgast, da das Gas nicht wieder durch die Membran zurückgelangen kann [49].

### **2.1.1.2 Gradientenmischer**

Ein Gradientenmischer muss nicht zwingend in einem HPLC-Gerät enthalten sein. Wenn nur mit einem einzigen Fließmittel gearbeitet wird, dessen Zusammensetzung während eines Laufes nicht verändert wird, nennt man dies eine isokratische Elution, wobei kein Gradientenmischer notwendig ist. Für schwierigere Trennprobleme werden aber häufig sogenannte Fließmittelgradienten verwendet. Dieses bezeichnet eine Veränderung des Mischungsverhältnisses des Elutionsmittels zumeist mit Steigerung der Elutionskraft im Laufe der Analyse. Solch ein Gradient kann aus zwei oder mehr Fließmitteln generiert werden, je nachdem wie aufwendig das Trennproblem ist. Man unterscheidet dabei zwischen Hoch- und Niederdruckgradientensystemen. Bei einem Niederdruckgradientensystem befindet sich der eigentliche Gradientenmischer (siehe Abb. 2-2, Ziffer 3) mit einem vorgeschalteten Ventil vor der Pumpe und die unterschiedlichen Fließmittelbestandteile werden in eine Mischkammer befördert, welche kontrolliert geöffnet und geschlossen werden kann, sodass die entsprechende mobile Phase reproduzierbar hergestellt werden kann [50]. Bei einem Hochdruckgradientensystem hingegen werden mehrere Pumpen benötigt, welche in diesem Fall vor den Gradientenmischer geschaltet sind. Hierbei wird für jedes eingesetzte Lösemittel, das Bestandteil des Gradienten ist eine eigene Pumpe benötigt, was dieses System wesentlich teurer macht. Bei Gradienten werden weiterhin Stufengradienten, die einfachste Form, bei der in festgelegten Zeitabständen das Mischungsverhältnis der mobilen Phase verändert wird und stufenlose Gradienten unterschieden. Gradienten kommen bei Trennungen zum Einsatz um die Elutionskraft der mobilen Phase zu erhöhen und auf diese Weise Substanzen zu beschleunigen, die sonst sehr spät eluiert werden oder gar auf der Säule verbleiben würden [51].

### **2.1.1.3 Pumpe**

Bei den Pumpen (siehe Abb. 2-2, Ziffer 4) von HPLC-Geräten ist es wichtig, dass diese präzise und weitgehend pulsationsarm arbeiten. Hierfür ist es notwendig, dass sie reproduzierbare Drücke von bis zu 400 bar liefern können, um konstante Flussraten zu gewährleisten. Diese können normalerweise zwischen 0,1 und 10 ml/min stufenlos eingestellt werden. Hierbei ist die Flusskonstanz wichtig, da ein pulsierendes Fließmittel zu Signalschwankungen am Detektor führen kann [50], was sich dann negativ auf die Präzision (vgl. Abschnitt 2.5.5) der Analysen, genauer die Präzision der Retentionszeiten und Peakflächen, auswirkt. Die eigentliche Funktion der Pumpe ist es, die mobile Phase aus dem Vorratsgefäß zu saugen und diese anschließend durch das restliche System (Injektor/Autosampler, Trennsäule, Detektor) zu transportieren. Hierfür werden fast

ausschließlich Kurzhub-Kolbenpumpen verwendet, welche verglichen mit den sogenannten Spritzenpumpen den Vorteil haben, dass sie kein begrenztes Fließmittelreservoir haben [52].

Es besteht die Möglichkeit das Spülventil (Ziffer 5) zu öffnen, um das Fließmittel gar nicht durch das komplette Gerät, sondern gleich in ein Abfallgefäß (Ziffer 10) zu leiten. Dieses ist sinnvoll um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen, damit diese nicht auf die Trennsäule gelangen und zu Störsignalen führen können.

#### **2.1.1.4 Injektor**

Der Injektor (siehe Abb. 2-2, Ziffer 6) wird auch häufig als Probeneinlass- oder Probenaufgabesystem bezeichnet. Dahinter verbirgt sich das Bauteil, welches die Probe in die mobile Phase und dann auf die Trennsäule gelangen lässt. Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten die Probe in das System zu injizieren - und zwar mit Hilfe eines automatischen Injektionssystems (Autosampler), über eine Dosierschleife bzw. -schleife oder mit Hilfe einer Injektionspritze und eines Septums [53]. Hierbei sind die Dosierschleifen ein wichtiger Part. Sie werden zunächst mit der Probelösung befüllt und anschließend wird der innere Bereich, der sechs Ventile enthält, gedreht (vgl. Abb. 2-2, Ziffer 7). Dadurch wird eine Verbindung zwischen der Probenschleife und der Säule geschaffen und die Probeninjektion erfolgt. Dosierschleifen kommen sowohl bei der Injektion mit einem manuellen Injektor, wie dem Rheodyne®-Injektor, welcher neben dem Autosampler noch an dem MERCK® Hitachi®-System (siehe Abschnitt 6.1.1.1) zu finden ist, aber nicht verwendet wurde, als auch bei Verwendung eines Autosamplers zum Einsatz. Dieser ermöglicht die weitgehende Automatisierung mehrerer aufeinander folgender Analysen, da die Möglichkeit besteht, mehrere Probenvials in einem quadratischen Probenhalter (engl.: rack) aufzubewahren und hintereinander weg aus ihnen zu injizieren. Dieses kann zuvor alles über die zugehörige Software programmiert werden, sodass der manuelle Aufwand gering ist und viele Analysen nacheinander getestet und aufgezeichnet werden können, sofern das System reibungslos läuft und ausreichend Fließmittel für alle geplanten Analysen vorhanden ist. Wichtig ist hierbei die exakte Injektion des gewünschten Probenvolumens, da diese wiederum einen direkten Einfluss auf die Analysenpräzision, genauer die Präzision der Peakflächen, und somit auf die Quantifizierbarkeit hat.

#### **2.1.1.5 Trennsäule**

Die Trennsäule (siehe Abb. 2-2, Ziffer 8) oder auch stationäre Phase ist der wichtigste Part eines HPLC-Systems, weil an dieser die eigentliche Auftrennung der Probe stattfindet. HPLC-Säulen gibt es in sehr unterschiedlichen Dimensionen (siehe Abb. 2-3) und auch je nach Einsatzgebiet mit verschiedenen Durchmessern (Einteilung lt. Meyer [54] - analytisch: 2 bis 5 mm, präparativ: 10 bis 25,4 mm).

Hergestellt werden die druckbeständigen Mäntel der meisten HPLC-Säulen aus einem Chrom-Nickel-Molybdän-Stahl, welcher unempfindlich gegenüber den verwendeten Lösemitteln ist [54]. Diese Stahlrohre sind mit kleinen Partikeln gefüllt, die sich nach Anwendungsgebiet in Korngröße, Porengröße, Partikelgröße und -material unterscheiden [55]. Sie werden als gepackte Säulen bezeichnet. Hierbei spielt der Teilchendurchmesser eine wichtige Rolle für die Trennung, da die Trennleistung (vgl. Abschnitt 2.2.2) steigt, je kleiner die verwendeten Teilchen sind. Der Teilchendurchmesser liegt idealerweise zwischen 5 und 25 µm und sollte möglichst gleichmäßig sein, um Druckschwankungen zu vermeiden [55]. Heutzutage kommen aber auch schon deutlich kleinere Partikel zum Einsatz. Seit den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts findet man auch immer mehr monolithische

stationäre Phasen, welche aus einem einzigen Stück poröser Materie wie einem organischen Polymer oder Silicagel bestehen [56,57]. Ihre Porosität lässt sehr hohe Flussraten, ohne beträchtlichen Rückdruck wie bei den klassischen gepackten Säulen zu, was eine schnellere Trennung ermöglicht [58].



**Abb. 2-3** eingesetzte HPLC-Trennsäulen; von oben nach unten: Phenomenex Größenausschluss-Säule mit Vorsäule, PSS Größenausschluss-Säule, Dionex Kationenaustauscher-Säule, Interchim Umkehrphasen-Säule mit Vorsäule und Dionex Anionenaustauscher-Säule (mehr Details zu den verwendeten Trennsäulen in Abschnitt 6.1.2)

Der unterschiedliche Aufbau der Trennsäulen wird in Abschnitt 2.1.2 getrennt nach dem verwendeten Trennprinzip genauer erläutert.

Häufig werden auch Vorsäulen verwendet (siehe Abb. 2-3, oberste Säule und vierte Säule von oben). Diese werden zwischen Injektor und Trennsäule installiert und sind mit sehr ähnlichem, oder sogar identischem Material gefüllt wie die Trennsäule. Sie dienen dem Schutz der Hauptsäule, da Verunreinigungen oder stark haftende Stoffe so nicht auf die eigentliche Trennsäule gelangen können und diese folglich geschont wird [59]. Da die Vorsäulen normalerweise sehr viel kleiner sind als die eigentlichen Trennsäulen, sind sie deutlich preiswerter und können einfacher ersetzt werden als die Hauptsäule.

Falls für die durchzuführende Trennung eine höhere Temperatur vorteilhaft ist, wird ein Säulenofen eingesetzt, welcher die Säule auf die gewünschte Temperatur erwärmt und dafür sorgt, dass die Temperatur gehalten wird. Dieses bringt häufig eine höhere Trennleistung. Allerdings muss bedacht werden, dass jede Säule abhängig von ihrem Material nur bei bestimmten Temperaturen beständig ist und auch Analyten häufig temperaturempfindlich sind (vgl. Abschnitt 3.3.5).

### 2.1.1.6 Detektor

In der HPLC kommen unterschiedliche Detektoren zum Einsatz. Welches Detektionsprinzip die beste Wahl ist, richtet sich nach den Eigenschaften des Analyten. So werden beispielsweise Fluoreszenz-, Brechungsindex-, Leitfähigkeits-, massenselektive und elektrochemische Detektoren, sowie UV/Vis-Detektoren eingesetzt [60]. Der letztgenannte ist

der am Häufigsten in der HPLC eingesetzte Detektor (siehe Abb. 2-2, Ziffer 9) [61]. Ein Vorteil ist, dass er die Möglichkeit der Quantifizierung bietet, da das Signal, genauer die Peakfläche, einen direkten Zusammenhang mit der Konzentration hat und so eine Kalibrierung möglich ist. Grund dafür ist, dass das Lambert-Beer'sche Gesetz (1) gilt, welches ausdrückt, dass die Absorption ( $A$ ) proportional zu Schichtdicke ( $b$ ) und der molaren Konzentration ( $c$ ) ist.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (1)$$

$A$  = Absorption

$\varepsilon$  = molarer Absorptionskoeffizient [ $1/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ]

$c$  = molare Konzentration [ $\text{mol/l}$ ]

$b$  = Schichtdicke [ $\text{cm}$ ]

Die Funktionsweise des UV/Vis-Detektors entspricht prinzipiell der eines UV/Vis-Spektrometers [62] mit dem Unterschied, dass der HPLC-Detektor im Vergleich zu den Küvetten des Spektrometers eine Durchflusszelle für die Detektion besitzt. Es wird monochromatisches Licht einer Wellenlänge aufgestrahlt, welches von den in den Analyten, oder speziell in diesem Fall Proteinen, vorhandenen Chromophoren absorbiert werden kann, während diese die Durchflusszelle durchwandern. Durch Verarbeitung dieses Signals in dem angeschlossenen Computer mit der entsprechenden Auswertesoftware kommt so ein Peak im Chromatogramm zustande. Bei Verwendung eines UV/Vis-Detektors kann immer nur bei einer Wellenlänge gemessen werden, was sofern die Absorptionsmaxima der zu analysierenden Substanzen bekannt sind, auch nicht problematisch ist. Bei einer Methodenentwicklung für Substanzen mit unbekannten Absorptionsmaxima hingegen ist es aber schwierig und aufwendig die beste Wellenlänge in vielen Läufen zu ermitteln. Hierfür kann idealerweise ein Dioden-Array-Detektor (DAD) eingesetzt werden. Dieser ist eine Weiterentwicklung des eigentlichen UV/Vis-Detektors, der bei mehreren Wellenlängen gleichzeitig messen kann und auf diese Weise ein komplettes Absorptionsspektrum aufnehmen kann, da ein gewählter Wellenlängenbereich ausgestrahlt wird. Dieses ermöglicht eine schnelle Identifizierung einer geeigneten Detektionswellenlänge, da aus dem aufgezeichneten Spektrum ersichtlich ist, wo der Analyt über ein Absorptionsmaximum verfügt [60].

Das Rauschen (engl.: noise) eines Detektors spielt für die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze einer Methode eine wichtige Rolle (vgl. Abschnitt 2.5.6 und 2.5.7). Wenn ein Chromatogramm betrachtet wird, in dem genügend große Peaks auftauchen, erscheint die dazugehörige Basislinie meist sehr glatt. Bei niedrigen Substanzkonzentrationen, beispielsweise bei Messungen zur Nachweis- und Bestimmungsgrenze oder wenn eine Blankinjektion (= ein Lauf ohne dass Probe injiziert wird) durchgeführt wird, fällt auf, dass die Basislinie nicht so glatt ist, wie sie sonst erscheint. Denn schon der Detektor an sich verursacht eine unruhige Basislinie, das sogenannte Rauschen. Dieses kann häufig auf die mobile Phase, auf ungenügende Erdung des Detektors oder auch auf Temperaturschwankungen zurückgeführt werden [63]. Nach Identifizierung des Grundes kann es dann idealerweise minimiert, aber nie ganz vermieden werden. Die anderen möglichen Detektoren kamen während der Messungen nicht zum Einsatz, weshalb sie nicht näher erläutert werden.

Nach dem Passieren des Detektors wird das Fließmittel mit der enthaltenen Probe in ein Abfallgefäß (Ziffer 10) geleitet.

### 2.1.1.7 Software/Datenauswertung

Verglichen mit den früher verwendeten Schreibern und Integratoren [64], ist die Datenauswertung durch den Einsatz von Computern mit spezieller Software (siehe Abb. 2-2, Ziffer 11) deutlich einfacher geworden. Hierbei hat jeder Gerätehersteller eine passende Software zu seinem HPLC-System etabliert, welche aber alle über ähnliche Funktionen verfügen. Die Software dient nicht nur der Datenaufzeichnung, sondern auch der Datenauswertung, sodass beispielsweise die Integration der Peakfläche bei den neueren Programmen (hier EZChrom Elite von VWR®) schon automatisch nach den vom Benutzer selbst gewählten Parametern erfolgt und nach einem Lauf direkt die Fläche für die Quantifizierung entnommen werden kann. Hierbei wird beispielsweise der Schwellenwert festgesetzt, ab wann ein Peak von der Software als Peak erkannt wird, oder auch die Grenzen eines Peaks, zum Beispiel Integration immer von 2,3 min bis 2,9 min, was eine Manipulation der Peakfläche zum Erreichen einer höheren Präzision ausschließt. Auch ein systematisches Speichern der Daten ist unter den angewendeten Methoden sehr einfach und übersichtlich möglich, wodurch das Drucken eines jeden aufgenommenen Chromatogrammes überflüssig wird.

### 2.1.2 Trennmechanismen

Wie schon kurz in Abschnitt 2.1 erwähnt, besteht die Möglichkeit sehr viele verschiedene Stoffe mit unterschiedlichen Eigenschaften zu trennen, indem unterschiedliche Trennmechanismen verwendet werden. Realisierbar ist dieses durch den Einsatz unterschiedlicher stationärer Phasen, sodass nur ein Austausch der Trennsäule erfolgen muss und kein Umbau des eigentlichen HPLC-Systems nötig ist. Einen Überblick über die häufig in der Protein- und Peptidanalytik verwendeten stationären Phasen und das zugehörige Trennprinzip gibt Tab. 2-1.

**Tab. 2-1 Stationäre Phasen mit zugehörigem Trennprinzip für die HPLC-Analytik von Proteinen und Peptiden modifiziert nach [65] und [66]**

<b>Trennmechanismus</b>	<b>Trennprinzip</b>
Größenausschlusschromatographie (SEC)	Trennung nach Proteingröße bzw. dem hydrodynamischen Radius
Kationenaustauschchromatographie * (CEC)	vorwiegend elektrostatische/ionische Wechselwirkungen
Anionenaustauschchromatographie * (AEC)	vorwiegend elektrostatische/ionische Wechselwirkungen
Umkehrphasenchromatographie (RP)	unpolare/hydrophobe Wechselwirkungen
Affinitätschromatographie (AC)	proteinspezifische Wechselwirkungen
Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	hydrophobe Wechselwirkungen
Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC)	hydrophile Wechselwirkungen

\* bei Anionen- und Kationenaustauschchromatographie wird jeweils noch zwischen starken und schwachen Austauschern unterschieden; siehe Abschnitt 2.1.2.3

Die in dieser Arbeit verwendeten und zum Vergleich herangezogenen Trennmechanismen werden im Folgenden noch ausführlich mit Aufbau und Funktionsweise erläutert. Eine Diskussion der eingesetzten mobilen Phasen findet sich in den zu den Trennmechanismen gehörigen Kapiteln im Rahmen der Methodenentwicklung.

### 2.1.2.1 Normal- und Umkehrphasenchromatographie

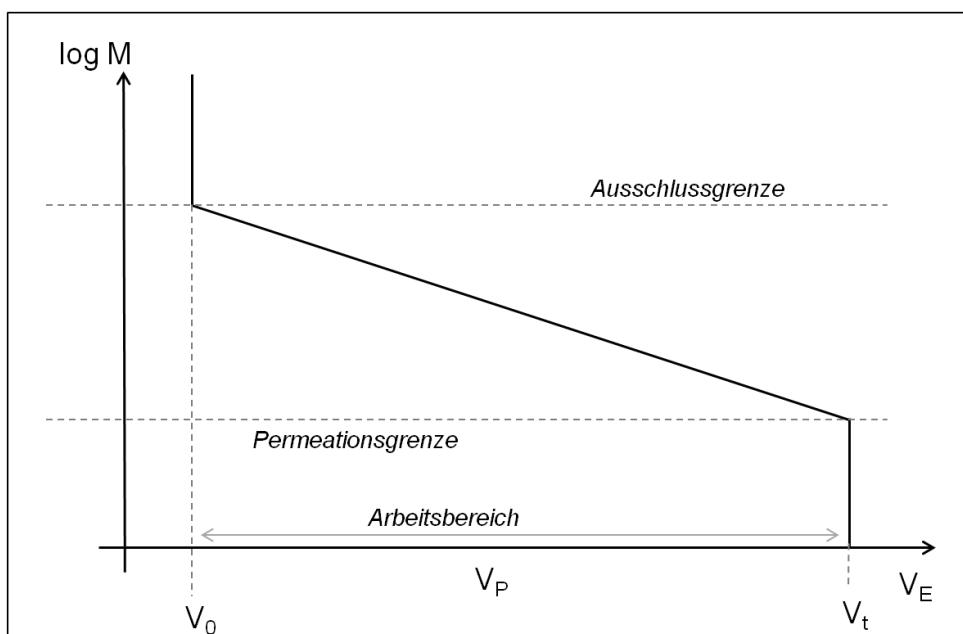
In der Normalphasenchromatographie oder auch Adsorptionschromatographie kommen üblicherweise Kieselgel ( $\text{SiO}_2$ ) oder Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) als poröse Materialien mit einer großen spezifischen Oberfläche als stationäre Phase zum Einsatz [55]. Mit diesem Trennmechanismus werden meist polare Stoffe getrennt, welche auf Grund von Polaritätsunterschieden unterschiedlich stark mit der ebenfalls polaren stationären Phase wechselwirken. Die hier in Frage kommenden Wechselwirkungen bzw. Bindungen sind: Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, induzierte Dipol-Wechselwirkungen (durch Einfluss des Umfeldes) oder  $\pi$ -Komplex-Bindungen von Molekülen mit Doppelbindungen oder freien Elektronenpaaren [67]. Geeignete Fließmittel können der elutropen Reihe [68] entnommen werden, wo sie auf Grund ihrer Elutionskraft eingeordnet wurden. In der Normalphasenchromatographie nimmt die Elutionsstärke mit zunehmender Polarität der mobilen Phase zu. Die elutrope Reihe dient als Orientierungshilfe bei der Komposition des Fließmittels für das vorliegende Trennproblem.

Die Umkehrphasenchromatographie (engl.: reversed phase chromatography oder kurz: RP) stellt, wie der Name vermuten lässt, eine „Umkehrung“ der Normalphasenchromatographie dar. In diesem Trennmechanismus nimmt die Elutionsstärke der mobilen Phase mit abnehmender Polarität zu – die elutrope Reihe muss also anders herum betrachtet werden. Häufig wird in der RP-Chromatographie mit einer Gradientenelution gearbeitet, aber auch isokratische Methoden sind möglich. Das in der Normalphasenchromatographie verwendete polare Kieselgel wird für den Einsatz in der RP-Chromatographie und die Trennung unpolarer Substanzen chemisch modifiziert, indem die Silanolgruppen des Kieselgels durch Anfügen unpolarer Alkylreste hydrophobisiert werden. Hierfür werden Alkylchlorsilane mit unterschiedlich langen Alkylresten eingesetzt. Je nach Länge des angeknüpften Alkylrestes spricht man hinterher beispielsweise von RP-4 für eine Umkehrphase, deren Silanolgruppen mit C4-Chlorsilanen umgesetzt wurden. Dieser Schritt wird als Silylierung oder Silanisierung bezeichnet. Da nach diesem Schritt noch immer polare Oberflächenstrukturen zu finden sind, schließt sich das sogenannte Endcapping, bzw. die Nachsilylierung z. B. mit dem kleineren Trimethylchlorsilan an, welches zwischen die zuvor angeknüpften langen Kohlenstoffketten gelangen kann [55]. Die Trennung der unpolaren Analyten erfolgt hierbei zumeist über hydrophobe Wechselwirkungen. Für die Peptid- und Proteinanalytik werden schon seit Jahren üblicherweise Säulen mit C-8- oder C-18-Resten mit einer Porengröße von 300 Å eingesetzt [69]. Zur Modifizierung des Elutionsverhaltens des Analyten werden häufig zur Hydrophobisierung der Proteine sogenannte Ionenpaarreagenzien zugesetzt. Hierbei handelt es sich um hydrophobe Säuren oder Basen, wie beispielsweise Trifluoressigsäure (TFA) oder Tetrabutylammonium, welche in niedrigen Konzentrationen (0,1-1%) der mobilen Phase zugefügt werden, um die Selektivität zu erhöhen [70,71]. In diesem Fall spricht man von Ionenpaar-Chromatographie.

### 2.1.2.2 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie (engl.: size exclusion chromatography, kurz: SEC) kommt es, wie Tab. 2-1 zeigt, im Gegensatz zu allen anderen aufgeführten Trennmechanismen nicht zu Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Idealerweise soll die Trennung der Analyten nur nach deren Größe, bzw. ihrem hydrodynamischen Radius und ohne Wechselwirkungen mit anderen Probenbestandteilen oder der Trennsäule erfolgen. Nach Verwendung unterschiedlicher Elutionsmittel unterscheidet man in der SEC zwischen der Gelpermeationschromatographie (GPC) bei Einsatz organischer Lösemittel

und der Gelfiltrationschromatographie (GFC) bei Einsatz wässriger Fließmittel [72]. Laut Abschnitt 2.2.30 des Arzneibuchkommentars zur Ausschlusschromatographie existiert in der SEC keine stationäre Phase [73]. Dieses ist allerdings nur aus physikalischer Sicht begründbar, da keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase stattfinden. An sich besteht diese aus unterschiedlichem porösem Material, wie beispielsweise Dextrane als polymere Gele oder auch modifiziertem Kieselgel, welches über unterschiedlich große aber definierte Poren verfügt. Während einer Analyse können kleine Proteine in diese Poren eindringen, während Größere diese umgehen müssen, da sie nicht herein gelangen können. Aus diesem Grund werden bei diesem Trennmechanismus große Proteine zuerst eluiert, während Kleinere die Trennsäule erst später verlassen. Dieses wird lt. Rücker [72] als der „inverse Siebeffekt“ bezeichnet. Sehr große Moleküle können überhaupt nicht in die Poren eindringen und verlassen die Säule sofort wieder mit dem Ausschlussvolumen ( $V_0$ ). Hieraus resultiert auch der Name dieses Trennmechanismus - die Größenausschlusschromatographie. Moleküle, die so klein sind, dass sie alle Poren komplett durchdringen können, die anders ausgedrückt: total permeieren, werden als letztes mit dem Totvolumen ( $V_t$ ) und der mobilen Phase, die auch alle Poren durchdringt, erfasst. Dieses begrenzt die Analysenzeit in der SEC – im Gegensatz zu allen anderen Trennmechanismen. Es ergibt sich also eine umgekehrt proportionale Reihenfolge zum hydrodynamischen Radius der Analyten [74]. Über eine Kalibration der verwendeten Trennsäule mit Substanzen bekannter Molekülmassen ist ein direkter Rückschluss auf die Größe der zu analysierenden Probe bzw. des Proteins möglich, da man in einem bestimmten Größen-Bereich (Einheit: Kilodalton, kDa) einen linearen Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen und den logarithmischen Molekülmassen erhält [72] (vgl. Abb. 2-4). Allerdings ist hier noch anzufügen, dass die „eigentliche“ Kalibrierfunktion nicht gerade ist, wie hier dargestellt, sondern gebogen, sofern keine logarithmierte Achse verwendet wird. Für die Kalibration werden den zu analysierenden Proben möglichst ähnliche Stoffe eingesetzt, die im selben Fließmittel analysiert werden – zur Größenbestimmung eines monoklonalen Antikörpers wird beispielsweise mit anderen Proteinen kalibriert (vgl. Abschnitt 3.2.5.1).



**Abb. 2-4 schematische Kalibrierkurve mit  $V_P$  = Porenvolumen,  $V_E$  = Elutionsvolumen,  $V_0$  = Ausschlussvolumen und  $V_t$  = Totvolumen; modifiziert nach Abb. 15.3 aus Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie [74] und der Symboldefinition des Arzneibuchkommentars zur Ausschlusschromatographie [73]; erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup>**



In der SEC werden statt der Retentionszeiten (vgl. Abschnitt 2.2) die Retentions- oder Elutionsvolumina angegeben, wie auch die Symbolerklärung aus Abb. 2-4 zeigt. Als charakteristische Kenngröße der SEC wird häufig der Verteilungskoeffizient ( $K_D$ ) wie in Gleichung (2) dargestellt, verwendet.

$$K_D = \frac{V_E - V_0}{V_t - V_0} \quad (2)$$

$V_E$ =Elutionsvolumen des betrachteten Peaks im Chromatogramm  
 $V_0$ =Ausschlussvolumen  
 $V_t$ =Totvolumen

Für den Verteilungskoeffizienten werden Werte zwischen null und eins erhalten, da für große Substanzen, welche nicht zurückgehalten werden und  $V_E=V_0$  gilt, ein Wert von null erhalten wird und für so kleine Substanzen, die komplett permeieren  $V_E=V_t$  gilt, was einen Wert von eins ergibt. Für alle Substanzen, die dazwischen eluieren kann also auch nur ein Wert zwischen diesen Grenzen ermittelt werden [72]. Für alle anderen Trennmechanismen wird als gleichzusetzende chromatographische Kenngröße das Massenverteilungsverhältnis bzw. der Kapazitätsfaktor (vgl. Abschnitt 2.2.1) verwendet.

Die Trennsäulen werden von unterschiedlichen Herstellern mit verschiedenen großen Trennbereichen angeboten, was eine unterschiedliche Trennleistung bzw. Selektivität impliziert, wenn Säulen mit verschiedenen großen Trennbereichen vorliegen (vgl. Diskussion in Abschnitt 3.2.1). Um eine Trennung mit der SEC erreichen zu können, ist ein Unterschied von 10-20 % der Molekülmasse der Analyten nötig [72].

In der SEC wird üblicherweise mit isokratischen Methoden gearbeitet, wobei momentan auch immer mehr Gradientenmethoden bei diesem Trennprinzip zum Einsatz kommen [75,76].

### 2.1.2.3 Ionenaustauschchromatographie

In der Ionenaustauschchromatographie (Ion Exchange Chromatography, kurz: IEX) werden verschiedene funktionelle Gruppen auf Kieselgel oder organische Harze wie Styrol-Divinylbenzol aufgebracht [77]. Je nach funktioneller Gruppe unterscheidet man zwischen Anionenaustauschern, die über positiv geladene Oberflächengruppen verfügen und Kationenaustauschern, bei denen die Oberflächengruppe negativ geladen ist. Eine weitere Unterteilung erfolgt über die Austauschkapazität, man unterscheidet starke und schwache Ionenaustauscher sowohl in der Kationen- als auch in der Anionenaustauschchromatographie. Die Trennung von Proteinen erfolgt hauptsächlich über deren unterschiedlich starke elektrostatische Wechselwirkungen mit der stationären Phase und einer Konkurrenz der vorhandenen Gegenionen. Hierbei spielen bei den Proteinen saure und basische Aminosäuren (vgl. Abschnitt 2.3) für die Wechselwirkungen eine Rolle. Bei genügend starker Affinität zur stationären Phase erfolgt ein Austausch des bisher gebundenen Gegenions. Daraus resultiert auch der Name der Ionenaustauschchromatographie. Bei diesem Trennmechanismus spielen pH-Wert und Ionenstärke der mobilen Phase eine größere Rolle als in den anderen Trennmechanismen, weil diese hier einen direkten Einfluss sowohl auf die Ladung der zu analysierenden Proteine, als auch auf den Protonierungsgrad der stationären Phase haben. Je nach gewähltem pH-Wert sind mehr oder weniger funktionelle Gruppen des Austauschers geladen, sodass die Kapazität bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich ist [77]. Dieses wirkt sich besonders bei den schwachen Ionenaustauschern aus (vgl. Abschnitt 3.3.2).

Für die eigentliche HPLC-Messung unter Einsatz eines Ionenaustauschers muss immer eine Gradientenelution erfolgen. Hierbei sind sowohl Salz- als auch pH-Gradienten möglich [78]. Da in dieser Arbeit nur Erstere eingesetzt wurden, wird dieses Prinzip hier erläutert. Die Probe wird in einem Puffer mit niedriger Ionenstärke gelöst, welcher auch zu Beginn als mobile Phase verwendet wird. Üblich sind Ionenstärken von 20 bis 50 mM [78]. In dieser Phase werden die Proteine, die mit der stationären Phase auf Grund ihrer Ladung wechselwirken dort zurückgehalten, Proteine ohne Ladung oder mit gleichgerichteter Ladung wie die stationäre Phase werden sofort eluiert. Nach und nach wird durch den eingesetzten Gradienten mit einem zweiten Puffer mit höherer Ionenstärke auch die Ionenstärke der mobilen Phase erhöht. Dieses hat zur Folge, dass die gebundenen Proteine je nach Stärke ihrer Bindung unterschiedlich schnell von der Oberfläche der stationären Phase verdrängt werden und eluieren.

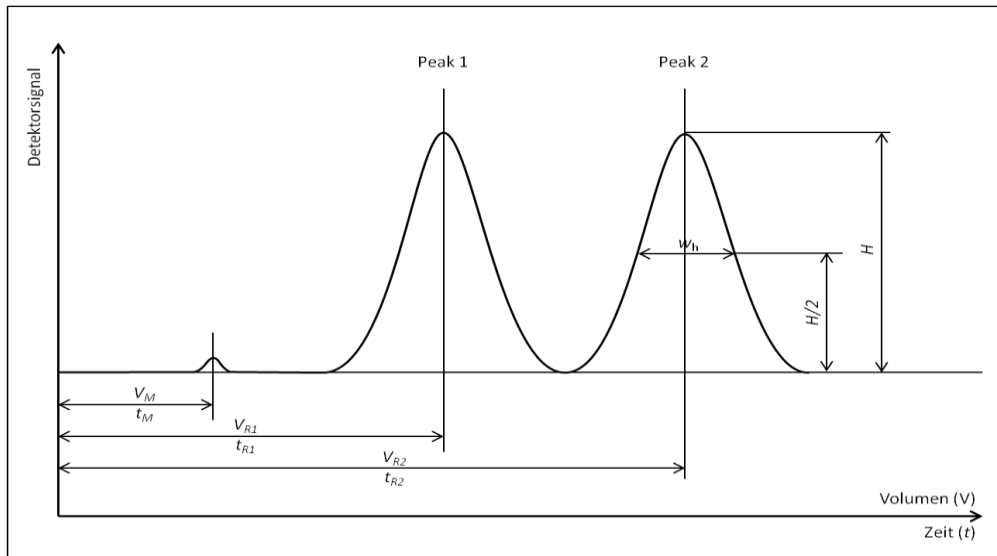
Wie zuvor angesprochen unterscheidet man zwischen schwachen Anionenaustauschern (WAX) mit  $\text{-NR}_2\text{H}^+$ - oder  $\text{-NH}_3^+$ -Gruppen und Starken (SAX) mit quartären Ammonium ( $\text{-NR}_3^+$ )-Gruppen [77,79]. In der Proteinanalytik werden sie in Abhängigkeit vom pH-Wert der mobilen Phase hauptsächlich für die Trennung von Proteinen mit isoelektrischen Punkten im sauren Bereich verwendet (vgl. Abschnitt 3.1). Auch in der Kationenaustauschchromatographie kommen starke (SCX) und schwache Austauscher (WCX) zum Einsatz. Übliche funktionelle Gruppen sind Sulfonsäure- ( $\text{-SO}_3^-$ ) für den starken und Carboxylgruppen ( $\text{-COO}^-$ ) für den schwachen Austauscher [77,79]. Sie werden häufig für die Trennung von Proteinen mit isoelektrischen Punkten im basischen Bereich eingesetzt, sofern der pH-Wert der mobilen Phase dafür geeignet ist. Generell können Proteine jedoch auf Grund ihres amphoteren Charakters (vgl. Erläuterung zu Proteinen und deren Aufbau in Abschnitt 2.3) sowohl mit der Anionenaustausch- als auch mit der Kationenaustauschchromatographie getrennt werden.

Eine Voraussage der Elutionsreihenfolge ist bei diesen Trennmechanismen meist nur annähernd möglich, da sehr viele Faktoren das Elutionsverhalten der Proteine und somit auch die Selektivität beeinflussen [77]. Einen Hinweis geben in der Proteinanalytik die isoelektrischen Punkte der vorliegenden Proteine. Daraus lässt sich schließen, welche Proteine bei den vorliegenden pH-Werten definitiv nicht mit der Trennsäule interagieren und diese sofort verlassen und welche mit der Säule in Wechselwirkung treten. Meist kann dann eine Reihung der isoelektrischen Punkte zufolge angenommen werden (vgl. Abschnitt 3.1 für die Anionenaustauschchromatographie und 3.3 für die Kationenaustauschchromatographie).

## **2.2 Chromatographische Parameter nach dem Europäischen Arzneibuch**

In Kapitel 2.2.46 des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur.) [80] mit dem Namen Chromatographische Trennmethode sind Parameter festgehalten und erläutert, die zur Beurteilung einer chromatographischen Trennung herangezogen werden können. Um diese berechnen zu können sind einige Kennzahlen aus dem betrachteten Chromatogramm zu entnehmen (Abb. 2-5). Generell wird bei einem äußeren Chromatogramm, wie es als Ergebnis einer HPLC-Trennung erhalten wird, die Intensität des Detektorsignals in Abhängigkeit von der Zeit bzw. dem Volumen aufgezeichnet [10]. Bei den meisten Trenntechniken wird die Abhängigkeit von der Zeit im Chromatogramm aufgezeichnet. Bei der Größenausschlusschromatographie hingegen ist es üblich das Volumen zu verwenden,

sodass man in dieser Technik von Retentionsvolumina an Stelle von Retentionszeiten spricht.



**Abb. 2-5 Chromatographische Kenngrößen in einem Beispielchromatogramm nach dem Europäischen Arzneibuch; modifiziert nach Abbildung 2.2.46-1 des Ph. Eur. 7.4, Grundwerk 2011; erstellt mit Microsoft PowerPoint®;  $t_M$  bzw.  $V_M$ =Totzeit bzw. Totvolumen,  $t_{R1}$ ,  $t_{R2}$  bzw.  $V_{R1}$ ,  $V_{R2}$ = Retentionszeit bzw. Retentionsvolumen eines Analyten,  $w_h$ =Peakhalbwertsbreite,  $H$ =Peakhöhe,  $H/2$ =halbe Peakhöhe**

Die Bedeutung der einzelnen Symbole der Kenngrößen sind der Legende zu Abb. 2-5 zu entnehmen. Die Begriffe der Tot- und der Retentionszeit sollen zum besseren Verständnis noch kurz erläutert werden. Unter der Totzeit eines Chromatogrammes versteht man die Zeit, die die mobile Phase vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Detektor benötigt. Die Retentionszeit hingegen ist die Zeit, die ein Analyt vom Zeitpunkt der Injektion bis zur Detektion benötigt. Häufig werden auch die Nettoretentionszeiten betrachtet. Diese erhält man, indem von der Retentionszeit die Totzeit abgezogen wird.

### 2.2.1 Massenverteilungsverhältnis

Da die Retentionszeiten sowohl von der Flussrate als auch von der Säulenlänge abhängig sind, sind diese für eine Substanzcharakterisierung wenig geeignet, weshalb man an dieser Stelle das Massenverteilungsverhältnis eingeführt hat. Dieses ist von den zuvor genannten Parametern unabhängig und gibt Auskunft darüber, wie das Verhältnis der Stoffmengen (Molverhältnis) des Analyten in stationärer und mobiler Phase ist [81]. Genauer gesagt versteht man darunter die Aufenthaltszeit einer Substanz in der stationären Phase im Verhältnis zur Aufenthaltszeit derselben Substanz in der mobilen Phase [82]. Das Massenverteilungsverhältnis ( $D_m$ ) wird oft auch als Kapazitäts- ( $k$ ) oder nach IUPAC (= International Union of Pure and Applied Chemistry, Internationale Union für reine und angewandte Chemie) als Retentionsfaktor ( $k$ ) bezeichnet und wird nach Gleichung (3) berechnet [83].

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

$t_R$ =Retentionszeit des betrachteten Peaks im Chromatogramm  
 $t_M$ =Totzeit

### 2.2.2 Plattenzahl

Die Plattenzahl, Trennstufenzahl oder auch Anzahl der theoretischen Böden ( $N$ ) kann nach Gleichung (4) berechnet werden. Diese ist ein Maß für die Säulen- bzw. Trennleistung und es gilt je höher der ermittelte Wert, desto größer die Trennleistung der Säule. Wichtig ist hierbei, dass Retentionszeit und Peakhalbwertsbreite in der gleichen Einheit eingesetzt werden. Der Faktor 5,54 kommt durch die Beziehung zwischen der Peakbasisbreite und der Peakhalbwertsbreite eines Gaußpeaks zustande, wenn für die Berechnung die Peakhalbwertsbreite verwendet wird. Die Plattenzahl ist dabei abhängig von Trennsäule, Säulentemperatur, mobiler Phase und Retentionszeit [83].

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (4)$$

$t_R$ =Retentionszeit des betrachteten Peaks im Chromatogramm  
 $w_h$ =Peakhalbwertsbreite

Um effiziente Trennungen durchzuführen, muss die Trennleistung einer Säule möglichst groß sein. Dieses spiegelt sich in vollständig getrennten schmalen Peaks wieder. Wenn eine Aussage über die Trennleistung getroffen werden soll, bei der die Säulenlänge berücksichtigt wird, dann verwendet man hierzu die Trennstufenhöhe ( $H$ ) (vgl. Gleichung 5 [83]). Diese wird auch häufig als *HETP* bezeichnet, was die Abkürzung für die englische Bezeichnung „height equivalent to one theoretical plate“ und dementsprechend auf Deutsch das Höhenequivalent eines theoretischen Bodens ist [84].

$$H(HETP) = \frac{L}{N} [mm] \quad (5)$$

$L$ =Säulenlänge in mm  
 $N$ =Anzahl der (theoretischen) Trennstufen

Bei einer Analyse von mehreren Substanzen in einem Chromatogramm fällt auf, dass Peaks mit kleineren Retentionszeiten normalerweise schmaler sind als die Peaks, die später eluieren also solche mit größeren Retentionszeiten. Man spricht hierbei von Peak- oder Bandenverbreiterung, welche durch die van Deemter-Beziehung (6) beschrieben und erklärt werden kann.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (6)$$

$A$ =Eddy-Diffusion (A-Term)  
 $B/u$ =Längsdiffusion (B-Term)  
 $C \cdot u$ =Massenübergang (C-Term)  
 $u$ =Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase

Die Eddy-Diffusion, Streudiffusion oder auch bezeichnet als der Mehrwegeeffekt drückt aus, dass die Probenmoleküle, welche mit der mobilen Phase durch die mit kleinen Partikeln gefüllte Säule transportiert werden, verschieden lange Wege zurücklegen können. Manche gelangen nahezu gradlinig hindurch und andere nehmen verschiedene Umwege, bevor sie die Säule wieder verlassen. Dieser Term ist unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase [85].

Die Längs- oder Longitudinaldiffusion berücksichtigt die Tatsache, dass die Probenmoleküle zusätzlich zu ihrer Bewegung durch die mobile Phase noch Eigenbewegungen ausführen,

welche nicht zwingend in Fließrichtung erfolgen. Den größten Beitrag zur Peakverbreiterung leisten dabei solche, die entgegen der Strömungsrichtung ausgeführt werden. Entgegen der Eddy-Diffusion besteht hierbei eine Abhängigkeit zur Strömungsgeschwindigkeit, was aus Gleichung (6) hervorgeht – bei Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit nimmt der Einfluss der Longitudinaldiffusion auf die Peakverbreiterung ab [85].

Unter dem Massenübergang versteht man die Zeit, welche für den Wechsel der Probenmoleküle von mobiler zu stationärer Phase und zurück nötig ist. Auch hierdurch kommt es zu weiterer Peakverbreiterung in Abhängigkeit von der Partikelgröße der stationären Phase und wiederum von der Strömungsgeschwindigkeit – bei höherer Strömungsgeschwindigkeit nimmt der Einfluss dieses Terms auf die Peakverbreiterung zu.

Die Aussagen zur Abhängigkeit von Longitudinaldiffusion und Massenübergang von der Strömungsgeschwindigkeit zeigen, dass für ein akzeptables Maß der Peakverbreiterung eine ideale Strömungsgeschwindigkeit eingestellt werden muss. Dieses geht auch aus der van Deemter-Kurve (Abb. 2-6) hervor. Diese stellt im Prinzip das Mittel aus den zuvor vorgestellten Termen A, B und C dar. Der tiefste Punkt dieser Kurve ist die optimale Strömungsgeschwindigkeit einer Trennung bezogen auf die Trennleistung [85].

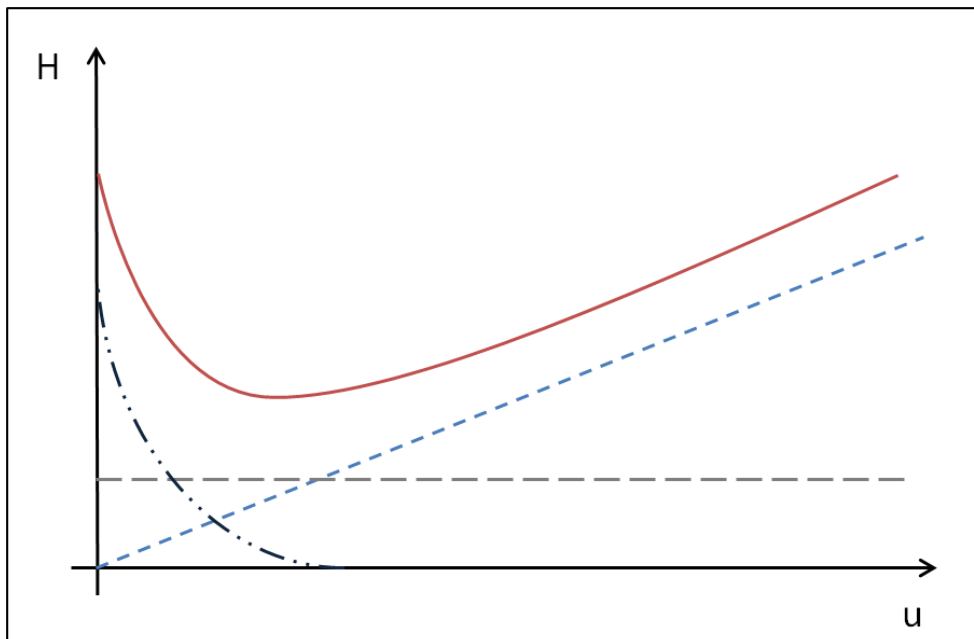


Abb. 2-6 einzelne Terme der van Deemter-Beziehung sowie die resultierende van Deemter-Kurve (rote durchgängige Linie); Eddy-Diffusion (graue gestrichelte Linie), Longitudinaldiffusion (dunkelblaue gepunktet und gestrichelte Linie), Massenübergang (blaue gestrichelte Linie); modifiziert nach Abbildung 2.7 aus [86]; erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup>

### 2.2.3 Symmetriefaktor

Der Symmetriefaktor ( $A_s$ ) eines Peaks gibt an, wie nah dieser einem ideal symmetrischen Peak ist. Unter Zuhilfenahme von Gleichung (7) [83] kann dieses berechnet werden. Die dafür nötigen Parameter eines Chromatogrammes sind in Abb. 2-7 dargestellt. Bei einem symmetrischen Peak wird ein Wert von 1,0 erhalten. Bei Werten von  $A_s > 1,0$  spricht man von Tailing und bei Werten von  $A_s < 1,0$  von Fronting oder Leading. Dieses kann Hinweise auf Missstände während einer Trennung geben. So werden häufig „leadende“ Peaks erhalten, wenn zu viel Substanz auf die Säule aufgebracht wurde oder „tailende“ bei Auftauchen von Totvolumina im System [87].

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (7)$$

$w_{0,05}$ =Peakbreite in einem Zwanzigstel der Peakhöhe

$d$ =die Entfernung in einem Zwanzigstel der Peakhöhe gemessen vom aufsteigenden Kurvenast zum Lot durch das Peakmaximum

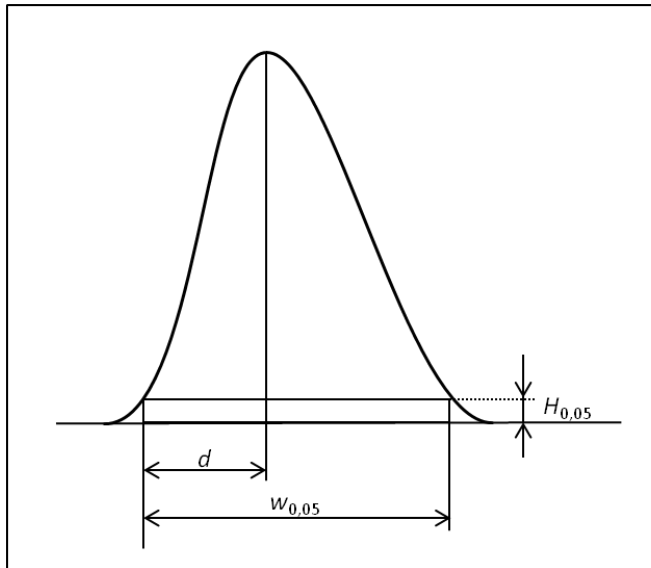


Abb. 2-7 Ermittlung der Peaksymmetrie nach dem Europäischen Arzneibuch; modifiziert nach Abbildung 2.2.46-5 des Ph. Eur. 7.4, Grundwerk 2011; erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup>

### 2.2.4 Auflösung

Über die Auflösung (engl.: resolution) kann entschieden werden, ob zwei Peaks wirklich als zwei separate Peaks betrachtet werden können oder ob sie zu dicht beieinander liegen und keine genaue Differenzierung möglich ist. Hierfür benötigt man sowohl die Retentionszeiten als auch die Peakhalbwertsbreiten aus dem betrachteten Chromatogramm, sodass anschließend unter Verwendung von Gleichung (8) die Auflösung ( $R_s$ ) berechnet werden kann. Die geforderte Basislinientrennung der Peaks wird ab einer Auflösung von 1,5 erreicht [83]. Für nicht basisliniengetrennte Peaks sollte diese Gleichung nicht zum Einsatz kommen. Hier wird stattdessen das Peak-Tal-Verhältnis (vgl. Abschnitt 2.2.5) zur Beurteilung der Trennung herangezogen.

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (8)$$

$t_{R1}$  und  $t_{R2}$ =Retentionszeiten der betrachteten Peaks;  $t_{R2}$  ist der Peak mit der größeren Retentionszeit  
 $w_{h1}$  und  $w_{h2}$ =Peakhalbwertsbreiten der betrachteten Peaks

### 2.2.5 Peak-Tal-Verhältnis

Das Peak-Tal-Verhältnis (engl.: peak-to-valley ratio) kann zur Auswertung zweier nicht basisliniengetrennter Peaks herangezogen werden (Auflösung < 1,5), damit eine weitere Differenzierung der Trennfortschritte möglich ist. Das Europäische Arzneibuch schlägt die Verwendung dieses Verhältnisses zur Überprüfung der Systemeignung bei der Prüfung auf verwandte Substanzen vor [80]. Das Peak-Tal-Verhältnis (p/v) berechnet sich nach Formel (9) [83]. Wie die nötigen Parameter aus einem Chromatogramm abgelesen werden zeigt Abb. 2-8.

$$p/v = \frac{H_p}{H_v} \quad (9)$$

$H_p$ =Höhe des kleineren Peaks über der extrapolierten Basislinie

$H_v$ =Höhe des niedrigsten Punktes der Kurve zwischen dem größeren und dem kleineren Peak über der extrapolierten Basislinie

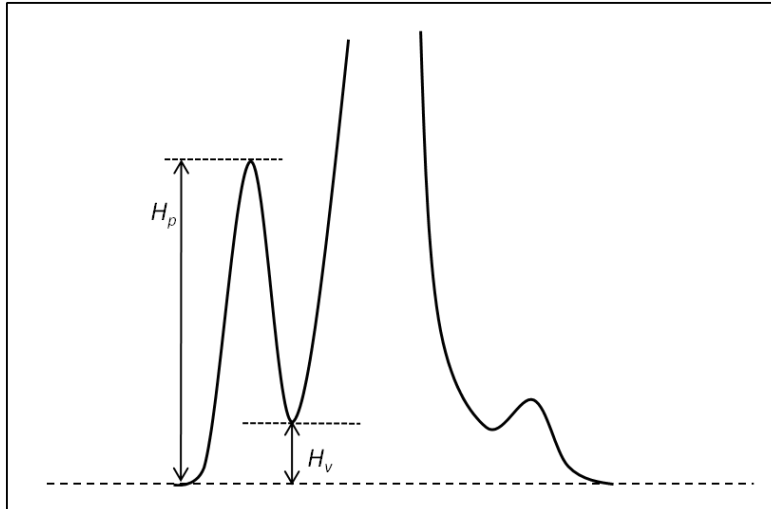


Abb. 2-8 Ermittlung des Peak-Tal-Verhältnisses nach dem Europäischen Arzneibuch; modifiziert nach Abbildung 2.2.46-6 des Ph. Eur. 7.4, Grundwerk 2011; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint®

### 2.2.6 Signal-Rausch-Verhältnis

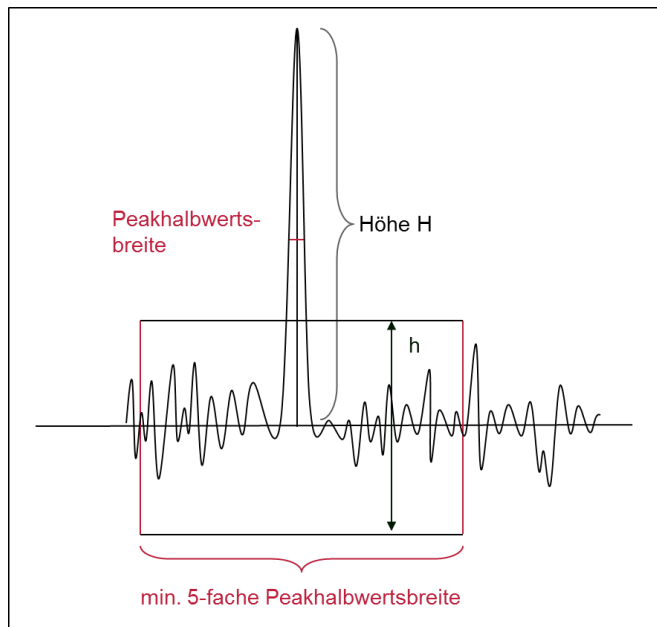
Mit Hilfe des Signal-Rausch-Verhältnisses (engl.: signal-to-noise ratio) kann ein Peak über Peakhöhe und -fläche als Substanzpeak identifiziert werden, wenn die Konzentration der Substanz groß genug ist. Wenn der Peak so klein ist, dass er sich kaum von dem Untergrundrauschen des Detektors unterscheiden lässt, muss dieser dem Rauschen zugeordnet werden. Dieses deutet meistens daraufhin, dass eine zu geringe Konzentration der Substanz vermessen wurde, wie es bei Ermittlung der Nachweisgrenze der Fall sein kann, oder das Rauschen zu groß ist. Da die Konzentration der vermessenen Substanz einen direkten Einfluss auf das Signal-Rausch-Verhältnis hat, wird dieses auch zur Hilfe genommen, um die Nachweis- und Bestimmungsgrenze einer Methode zu ermitteln (vgl. Abschnitt 2.5.6 und 2.5.7). Weiterhin wird die Präzision (vgl. Abschnitt 2.6.5) einer Methode durch das Signal-Rausch-Verhältnis beeinflusst.

Das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) kann nach Formel (10) [83] bestimmt werden. Die Ermittlung der Parameter für diese Formel ist in Abb. 2-9 dargestellt.

$$S/N = \frac{2H}{h} \quad (10)$$

$H$ =Höhe des betrachteten Peaks, gemessen vom Peakmaximum bis zur extrapolierten Basislinie

$h$ =Bereich des Rauschens in einem Chromatogramm, der mindestens auf der 5-fachen Peakhalbwertsbreite betrachtet werden muss



**Abb. 2-9 Ermittlung des Signal-Rausch-Verhältnisses nach dem Europäischen Arzneibuch; modifiziert nach Abbildung 2.2.46-7 des Ph. Eur. 7.4, Grundwerk 2011; erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup>**

### 2.3 Proteine

Bei fast allen biologischen Prozessen sind Proteine beteiligt und übernehmen zum Teil wichtige Rollen. So dienen Proteine beispielsweise in Form von Antikörpern (Immunglobulinen) der Infektionsabwehr oder in Form von Enzymen, welche auch als Biokatalysatoren bezeichnet werden, zur Katalyse wichtiger Reaktionen im menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Organismus [88]. In Form von Kollagen sind Proteine die strukturgebenden Bausteine von Knorpeln und Knochen oder als Keratin in Haaren und Nägeln. Als Transportproteine nehmen z.B. Hämoglobin für Sauerstoff und Transferrin für Eisen wichtige Rollen ein. Als Hormone übernehmen Proteine eine Übermittlerfunktion. So dient beispielsweise das Insulin als Peptid-Hormon zur Regulation des Blutzuckerspiegels [88]. Die variierenden Einsatzgebiete von Proteinen sind durch deren unterschiedliche Struktur bedingt. Hier spielen eine unterschiedliche Zusammensetzung der Aminosäuren als Grundbausteine, sowie die räumliche Anordnung oder die Kombination mit beispielsweise Metallionen eine Rolle [89].

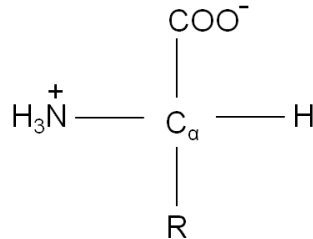
Wie schon in der Einleitung erwähnt, werden auch immer mehr proteinbasierte Arzneistoffe zur Behandlung unterschiedlicher Krankheiten eingesetzt. Hierbei handelt es sich häufig um Immunglobuline in Form von monoklonalen Antikörpern (vgl. Abschnitt 2.3.3). Diese werden über gentechnische Methoden hergestellt [90]. Auf diese Weise werden z.B. auch therapeutisches Somatotropin als Wachstumshormon oder Insulin für Diabetiker hergestellt [26].

#### 2.3.1 Aufbau und Struktur

Proteine und Peptide sind jeweils aus den sogenannten proteinogenen Aminosäuren aufgebaut. Der Unterschied zwischen ihnen liegt in der Anzahl der miteinander verknüpften Aminosäuren. So bestehen Peptide aus nicht mehr als 50 Aminosäuren [91]. Proteine hingegen sind aus über 50 Aminosäuren aufgebaut, verfügen über eine stabile dreidimensionale Struktur in wässrigen Lösungen [91] und haben eine Molekularmasse von



mindestens 5 kDa [92]. Der allgemeine Aufbau der zwitterionischen  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren ist schematisch in Abb. 2-10 dargestellt. Eine Übersicht über alle proteinogenen Aminosäuren ist z.B. in [93] zu finden. Diese werden je nach Aufbau der Seitenkette in neutrale, saure und basische Aminosäuren unterteilt.



**Abb. 2-10** allgemeine schematische Struktur einer  $\alpha$ -Aminocarbonsäure,  $\text{COO}^-$ =deprotonierte Carbonsäure,  $\text{NH}_3^+$ =protonierte Aminogruppe, R=je nach Aminosäure anderer Rest; nach [94]; erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup>

Aminosäuren werden durch Peptidbindungen kovalent miteinander verknüpft, wodurch Proteine und Peptide entstehen. Unter Wasserabspaltung bilden sich so unverzweigte Ketten durch die Reaktion der Carboxylgruppe einer Aminosäure und der Aminogruppe einer anderen. Auf diese Weise entstehen Polypeptidketten, die an einem Ende eine Aminogruppe aufweisen (N-Terminus) und am anderen Ende eine Carboxylgruppe (C-Terminus) [89]. Hierbei handelt es sich um die Primärsequenz bzw. -struktur der Proteine, welche durch die Nukleotidsequenz der DNA bedingt ist. Die räumliche Anordnung dieser Polypeptidkette ist durch die Aminosäuresequenz gegeben. Durch Faltungen entsteht auf diese Weise die Sekundärstruktur, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen gefestigt wird. Die wichtigsten Sekundärstrukturen sind die geschraubte  $\alpha$ -Helix und die  $\beta$ -Faltblattstruktur [92]. Unter der Tertiärstruktur eines Proteins wird die räumliche Anordnung (dreidimensional) der unterschiedlichen Sekundärstrukturen verstanden. Hierfür sind wie für die Ausbildung der Sekundärstruktur physikalische Wechselwirkungen (z.B. van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen, Disulfidbrücken) zwischen den unterschiedlichen Seitenketten der Aminosäuren zuständig, wodurch eine sogenannte Proteinuntereinheit entsteht [95]. Die letzte Strukturebene der Proteine ist die Quartärstruktur, welche die Kombination mehrerer Proteinuntereinheiten beschreibt. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Strukturebenen bietet Krämer [96].

Durch den unterschiedlichen Anteil an sauren und basischen Aminosäuren und deren Anordnung in Proteinen besitzen diese einen sauren, basischen oder neutralen Charakter. Dieser entsteht durch die unterschiedlichen Aminosäurereste, welche protonierbar oder deprotonierbar sind. Hierdurch handelt es sich auch bei Proteinen, wie bei Aminosäuren, um amphotere Moleküle. Für jedes Protein existiert ein pH-Wert, bei dem es ungeladen vorliegt, da sich an diesem Punkt dessen negative und positive Ladungen neutralisieren. Dieses wird als der isoelektrische Punkt eines Proteins bezeichnet [89]. Weiterhin können nach der Proteinsynthese viele unterschiedliche posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Sulfatierungen erfolgen, welche sich wiederum auf die Proteineigenschaften auswirken [97,98].

Wie schon in Kapitel 2.1.1.6 angesprochen, wird in der HPLC meist mit UV-Detektion gearbeitet. Bei Wellenlängen unter 220 nm absorbieren die Peptidbindungen stark UV-Licht,

weshalb sich in diesem Bereich die Proteindetektion anbietet. Da einige Aminosäuren aromatische Teilstrukturen besitzen, ist auch eine Detektion zwischen 250 und 290 nm möglich [91].

### 2.3.2 Modellproteine

Die verwendeten Modellproteine wurden nach ihren physikalischen Eigenschaften, wie ihren isoelektrischen Punkten und ihrer Molekülmasse ausgewählt. Durch Unterschiede in diesen Eigenschaften war eine Auftrennung durch die verschiedenen Methoden möglich. Die eingesetzten Proteine sind mit den zugehörigen Eigenschaften in Tab. 2-2 dargestellt.

**Tab. 2-2 eingesetzte Proteine mit Eigenschaften**

Protein	M [Da]	pI
β-Casein <sup>a)</sup>	24.020	5,0
BSA <sup>b)</sup>	66.000	4,2-4,9
Cytochrom C <sup>b)</sup>	13.000	10,1
Lysozym <sup>c)</sup>	14.300	11,1
Myoglobin <sup>b)</sup>	17.000	6,99
Ovalbumin <sup>b)</sup>	45.000	4,9

<sup>a)</sup> Pan et al. [99]

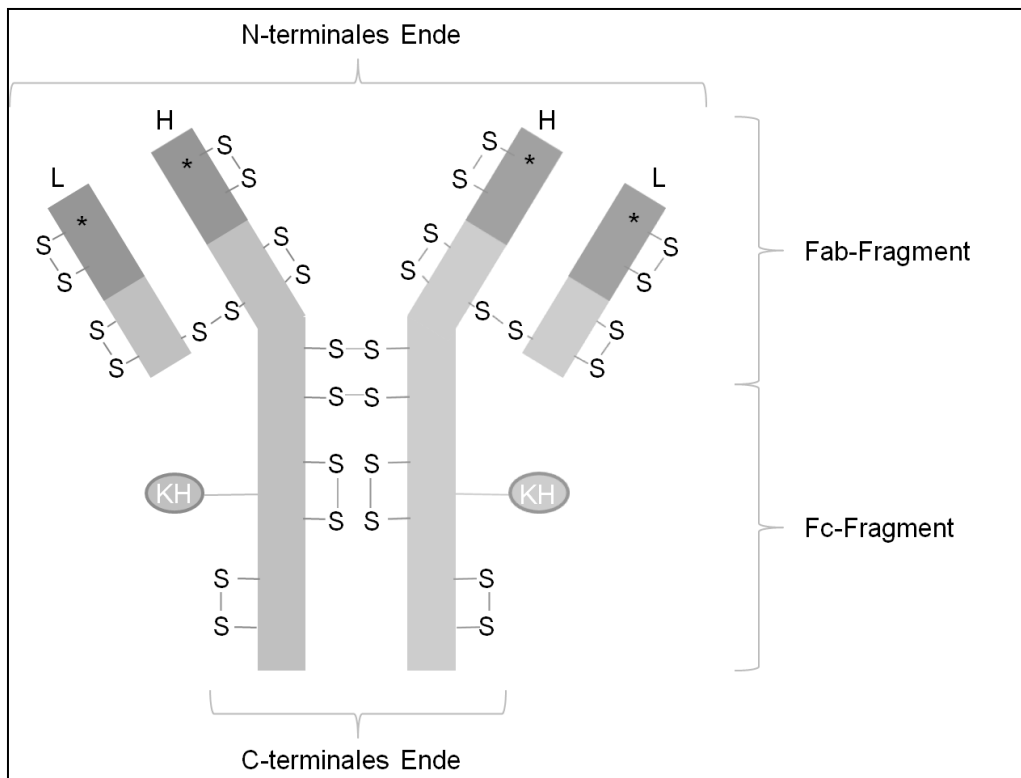
<sup>b)</sup> Dumetz et al. [100]

<sup>c)</sup> Gochman-Hecht et al. [101]

Bei der Recherche nach den Proteineigenschaften der Modellproteine wurden verschiedene Quellen berücksichtigt. Neben gängigen Proteindatenbanken (<http://www.uniprot.org> und <http://www.rcsb.org>) wurde auch auf der Homepage des Herstellers, Sigma Aldrich, und in verschiedenen Publikationen nach den ermittelten molaren Massen und den isoelektrischen Punkten recherchiert. Hierbei fiel auf, dass sich die angegebenen Werte geringfügig unterschieden, je nachdem welche Mess- oder Rechenmethode zur Ermittlung herangezogen wurde. Aus diesem Grund wurden die in Tab. 2-2 aufgeführten Quellen mit den angegebenen Proteineigenschaften verwendet.

### 2.3.3 Immunglobuline

Es existieren fünf Hauptklassen von Immunglobulinen (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), welche teilweise noch in Untergruppen (IgA mit zwei Subtypen und IgG mit vier Subtypen) unterteilt werden können [102]. Als Basis verfügen die Immunglobuline über zwei aus Aminosäuren aufgebaute gleiche leichte Ketten (engl.: light chains) mit einem Molekulargewicht von etwa 25 kDa und über zwei identische schwere Ketten (engl.: heavy chains) mit einem Molekulargewicht von 50-77 kDa, welche über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind [103]. Der schematische Aufbau eines IgG1-Antikörpers ist in Abb. 2-11 dargestellt. Dieser verfügt als glomeruläres (= knäueförmiges) Protein über eine Molekularmasse von ungefähr 150 kDa [102] und kommt im menschlichen Körper hauptsächlich im Blutplasma und der Gewebsflüssigkeit vor [104]. IgG-Antikörper stellen den größten Anteil der Blutantikörper, weshalb sie meistens als Beispiel präsentiert werden [102]. Da in den nachfolgenden Versuchen ein monoklonaler Antikörper vom IgG1-Typ verwendet wurde, wurde dieser hier näher beschrieben. Details über die anderen Immunglobuline sind in der nachfolgend genannten Literatur zu finden.



**Abb. 2-11 schematische Darstellung eines IgG1-Immunglobulins mit L=leichte Kette, H=schwere Kette, KH=Oligosaccharid, \*=variable Domäne; modifiziert nach [105]; erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup>**

Eine Übersicht über die schematische Struktur aller Immunglobuline findet sich in [106]. Weitere Details wie die genaue Zusammensetzung, ihr Vorkommen und deren Eigenschaften sind in [107] aufgeführt. Antikörper verfügen über Antigenbindungsstellen an der variablen Domäne zwischen schwerer und leichter Kette [104]. Hiermit sind sie im Stande Antigene zu erkennen, zu binden und somit die humorale Immunantwort zu starten [108]. Genauer zur adaptiven Immunantwort findet sich in [109] und [110].

### 2.3.3.1 Monoklonale Antikörper

Bei monoklonalen Antikörpern handelt es sich um Immunglobuline, welche biotechnologisch aus einer einzelnen B-Lymphozytenzelle hergestellt wurden und sich gegen ein einzelnes Antigen richten [103]. Das Europäische Arzneibuch definiert in der zugehörigen Arzneibuchmonographie „Monoklonale Antikörper für Menschen“ noch ein wenig konkreter und gibt auch Anweisungen für deren Herstellung. Hiernach handelt es sich bei monoklonalen Antikörpern um aus einem einzelnen Zellklon hergestellte Zubereitungen aus einem Immunglobulin oder einem Immunglobulinfragment mit definierter Spezifität. Diese können durch geklonte, immortalisierte B-Lymphozyten Zelllinien oder aus rDNA-rekombinationstechnisch hergestellten Zelllinien produziert werden [22]. Weiterhin werden chimäre (Endung: -ximab [111]), humanisierte (Endung: -zumab [111]) und rekombinante (Endung: -umab [111]) monoklonale Antikörper vom Menschen unterschieden. Die jeweilige Bezeichnung richtet sich nach dem ausgetauschten Teil des produzierten Antikörpers. So wird beispielsweise bei einem rekombinanten Antikörper die variable Domäne von schwerer und leichter Kette eines menschlichen Antikörpers mit einem konstanten Teil eines menschlichen Antikörpers kombiniert [22]. Da hierbei der gesamte Antikörper vom Menschen stammt, ist das allergene Potential relativ gering im Gegensatz zu solchen, bei denen ein

Großteil der Maus entstammt (vgl. den von Teuscher beschriebenen Unterschied zwischen chimären und humanisierten monoklonalen Antikörpern [112]).

Üblicherweise kommt es bei der Reizung des Körpers mit einem bestimmten Antigen zur Produktion mehrerer spezifischer Antikörper, da ein Antigen meist über mehrere Strukturelemente (Epitope) verfügt, gegen die sich die Antikörper richten. Demzufolge liegt ein polyklonales Antikörpergemisch vor. Monoklonale Antikörper hingegen sind nur gegen ein bestimmtes Epitop eines Antigens gerichtet, was für den diagnostischen und therapeutischen Einsatz sinnvoll ist [112]. Eine Übersicht über zugelassene monoklonale Antikörper ist über die Homepage des Paul-Ehrlich-Institutes einsehbar [113]. In dieser Tabelle sind auch deren Angriffspunkte im Organismus (z.B. Adalimumab, Handelsname Humira® als Anti-TNF alpha (= Anti-Tumornekrosefaktor alpha) zum Einsatz bei rheumatoider Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa aufgeführt [114].

Um identische Antikörper herzustellen ist in der zugehörigen Arzneibuchmonographie nicht nur das Produkt aufgeführt, sondern auch die nötigen Spezifikationen der Herstellung. Trotz Reglementierung und Validierung der Herstellungsprozesse [22] werden auch in authentischen Zellen Molekülvariationen produziert, welche als Mikroheterogenität bezeichnet werden [115]. Das zumeist beschriebene Herstellungsverfahren für monoklonale Antikörper ist das von Köhler und Milstein entwickelte Hybridomverfahren in Mäusen. Dieses ist in folgenden Werken [116–119] ausführlich beschrieben und wird aus diesem Grund hier nicht näher ausgeführt. Häufig werden monoklonale Antikörper auch in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) produziert. Birch et al. sprechen sogar von einer gleichmäßigen Verteilung zwischen der Produktion von mAbs in Mäusen und chinesischen Hamstern [120].

### 2.4 Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse (TXRF)

Für die Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse bzw. -spektrometrie findet man neben der Abkürzung TXRF für die englische Bezeichnung „Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis“ im Deutschen auch häufig TRFA (=Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse). Da aber meistens die englische Abkürzung Anwendung findet, ist dies auch in dieser Arbeit der Fall. Die Existenz der Totalreflexion wurde 1922 von Compton bewiesen [38]. Der erste analytische Einsatz der TXRF ist durch Yoneda und Horiuchi im Jahr 1971 verzeichnet, wobei gezeigt werden konnte, dass mit der TXRF sehr kleine Menge Eisen, Chrom, Nickel und Zink bestimmbar sind [39]. Verglichen mit der klassischen Röntgenfluoreszenzanalyse (engl.: X-ray Fluorescence Analysis, XRF oder XRFS), aus welcher sie entwickelt wurde, besitzt die TXRF den Vorteil der besseren Empfindlichkeit [121] und der weitgehenden Unabhängigkeit von Matrixeffekten [43]. Dieses ermöglicht eine sehr einfache Probenvorbereitung, sodass beispielsweise keine Isolation der zu bestimmenden Elemente aus biologischen Proben erfolgen muss [44]. Die gesteigerte Empfindlichkeit dieser Technik resultiert aus dem sehr kleinen Einfallswinkel der Röntgenstrahlung, welche von Klockenkämper und von Bohlen als „shaped like a strip of paper“ (deutsch: „geformt wie ein Streifen Papier“) beschrieben wird [121]. Dadurch wird bei dem Auftreffen auf die Oberfläche eines Glasreflektors (bzw. Probenträger aus Quarzglas) in einem sehr kleinen Winkel das Streulicht reduziert, da der Großteil der Anregungsstrahlung totalreflektiert wird [40]. Durch den flachen Einfallswinkel und die resultierende Totalreflexion kommt es zu einer doppelten Anregung der Probe, was neben dem geringen Abstand von Probe und Detektor für die hohe

Empfindlichkeit dieser Methode verantwortlich ist [42,122]. Ein weiterer Vorteil sind die sehr niedrigen Detektionsgrenzen [42], weshalb die TXRF schon seit einigen Jahren häufig ihren Einsatz in der Spurenanalytik findet [43,121]. Durch die Matrixunabhängigkeit ist auch die Bestimmung von Metallen aus biologischen Proben möglich [45,46]. Außerdem wird die TXRF zur Oberflächenanalyse in der Halbleiterindustrie verwendet [123]. Eine Übersicht über mögliche Applikationen der TXRF ist in [42] zu finden.

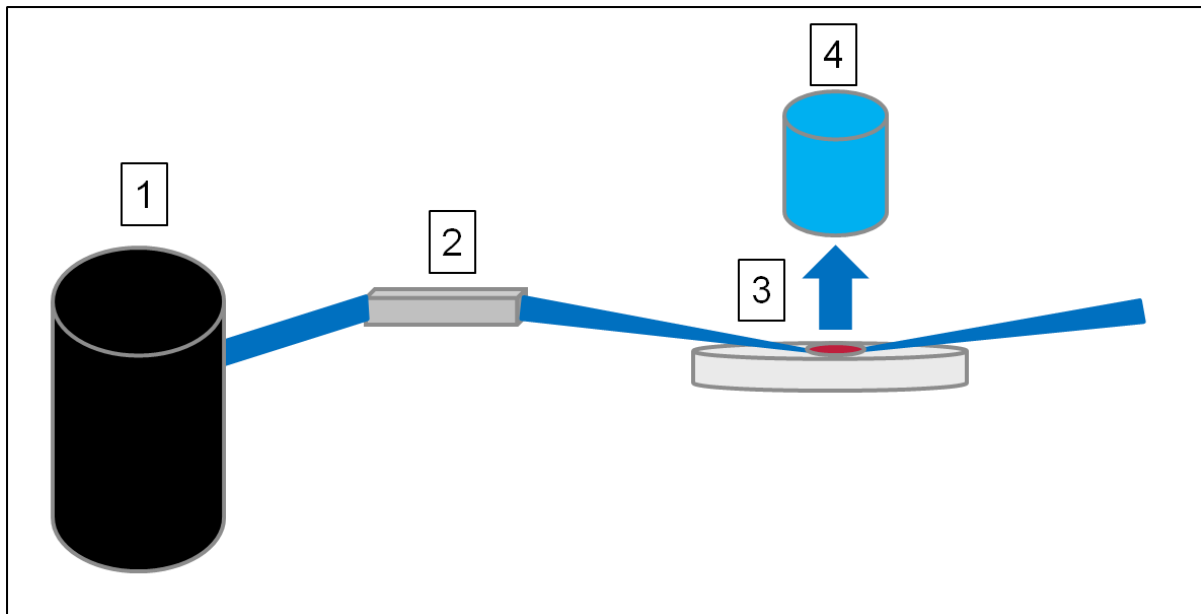
### 2.4.1 Aufbau und Prinzip eines TXRF-Systems

Das verwendete TXRF-System ist in Abb. 2-12 dargestellt. Hierbei handelt es sich um ein TXRF-Spektrometer mit zugehöriger Auswerteeinheit in Form eines Laptops.



**Abb. 2-12 verwendetes TXRF-Gerät: S2 Picofox; Verwendung mit Erlaubnis der Bruker Nano GmbH**

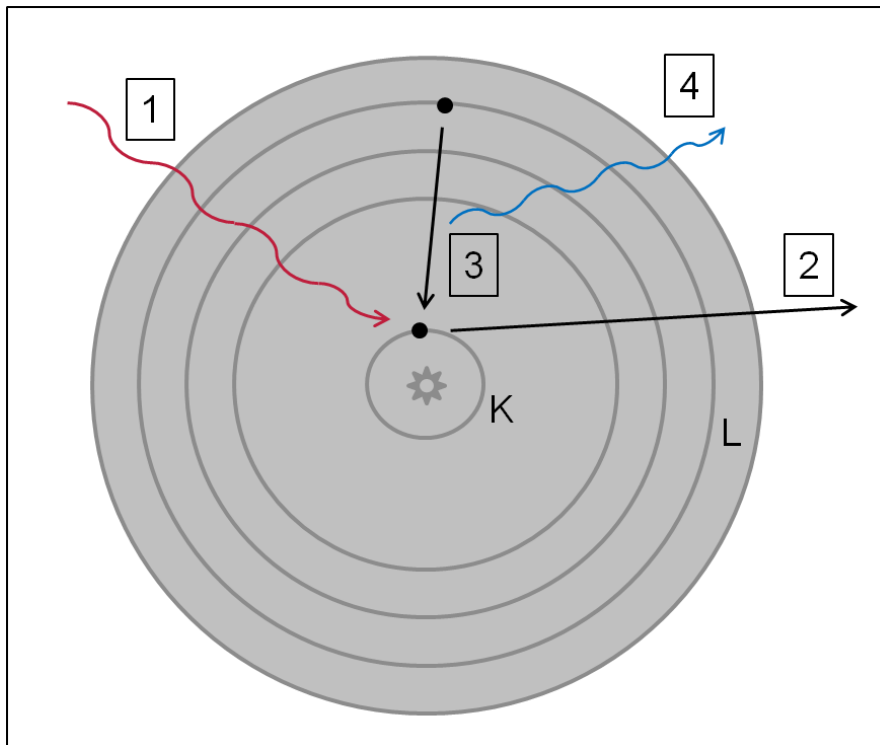
Den schematischen Aufbau eines solchen Systems zeigt Abb. 2-13. Durch die Röntgenröhre (1) wird Röntgenstrahlung ausgesendet, welche zunächst durch die strahladaptierende Einheit (2) und anschließend in einem sehr flachen Winkel auf den polierten Probenträger (3) fällt. Auf diesen ist die zu untersuchende Substanz in einer dünnen Schicht in getrockneter Form aufgebracht. Durch den geringen Einfallswinkel der Röntgenstrahlung und die polierte Oberfläche des Trägers findet hier die Totalreflexion der Röntgenstrahlung statt, welche zur Emission von Röntgenfluoreszenzstrahlung (vgl. Abschnitt 2.4.1.1) der Probe führt. Diese wird durch den dicht darüber in senkrechter Position angebrachten Detektor registriert und an die zugehörige Auswerteeinheit weiter geleitet. Die Erklärung eines typischen TXRF-Spektrums ist in Kapitel 4.1.2.1 zu finden. Mögliche weitere Anordnungen in einem TXRF-Spektrometer sind in [41] aufgeführt.



**Abb. 2-13 schematischer Aufbau und Messprinzip eines TXRF-Spektrometers; 1) Röntgenstrahler, 2) strahladaptierende Einheit, 3) Probenträger mit Probe, 4) Detektor, modifiziert nach [42] und [124]; erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup>**

### 2.4.1.1 Entstehung der Röntgenfluoreszenz

Die Entstehung der Röntgenfluoreszenz ist schematisch in Abb. 2-14 dargestellt. Durch einen Röntgenstrahler wird energiereiche primäre Röntgenstrahlung auf eine Probe aufgestrahlt (1), woraufhin ein oder mehrere Elektronen mit geringem Energieniveau aus dem Inneren des bestrahlten Atoms herausgeschlagen werden (2). Die auf diese Weise entstandene Lücke wird nun durch ein weiter außen liegendes Elektron mit einem höheren Energieniveau gefüllt (3). Die überschüssige Energie wird in Form von sekundärer Röntgenstrahlung abgegeben (4), welche als Röntgenfluoreszenz bezeichnet wird [125]. Die Energie des Röntgenphotons entspricht dabei der Differenz zwischen dem früheren und dem erreichten Energiestatus des Atoms des betrachteten Elementes [125]. Hierbei handelt es sich um einen charakteristischen Wert für alle Atome eines Elementes. Resultat dieser spezifischen Energie des Röntgenphotons sind die im Spektrum dargestellten Spektrallinien mit der Einheit Kilo-Elektronenvolt (keV) (vgl. Kapitel 4.1.2.1 Abb. 4-2 bis 4-4), welche zur Identifizierung der Elemente herangezogen werden können [125]. Die Intensität mit der Einheit Zählsschritte pro Sekunde (engl.: counts per seconds, cps), ermöglicht hingegen eine Aussage über die Konzentration des Elementes (vgl. Abschnitt 2.4.1.6).



**Abb. 2-14 schematische Entstehung der Röntgenfluoreszenz; 1) Anregung eines Atoms durch Röntgenstrahlung, 2) Ionisation eines Elektrons geringen Energieniveaus, 3) Auffüllen der entstandenen Fehlstelle mit einem Elektron höheren Energieniveaus, 4) Energiedifferenz wird in Form eines Röntgenquants abgegeben (Röntgenfluoreszenz); modifiziert nach [126] und [127]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint®**

#### 2.4.1.2 Grundlagen der Totalreflexion

Betrachtet man den Verlauf von Röntgenstrahlen in einem einzigen Medium, so folgen diese stets einem geraden Weg. Treffen sie jedoch auf ein zweites Medium mit anderer Dichte als das Ausgangsmedium so werden sie, je nach Winkel, an der Grenzschicht gebrochen oder reflektiert [128]. Da praktisch jedes andere Medium für Röntgenstrahlen optisch dünner ist als ein Vakuum, findet eine Brechung des einfallenden Röntgenstrahls in diesem Fall vom Lot weg, in Richtung Grenzfläche zwischen beiden Medien statt [129]. Totalreflexion entsteht wenn die einfallende Röntgenstrahlung nicht in das zweite optisch dünnere Medium eindringt, sondern durch die Grenzzone zwischen beiden Medien die Strahlung wie ein Spiegel in das Ausgangsmedium zurück reflektiert [129]. Aus diesem Grund werden als Probenträger unterschiedliche Materialien mit einer polierten Oberfläche verwendet (vgl. Abschnitt 2.4.1.4). Damit die Totalreflexion auftritt, muss ein bestimmter Einfallswinkel der Röntgenstrahlung eingestellt werden [130]. Dieser lässt sich über das Snelliussche Brechungsgesetz (11) ermitteln [128,131].

$$\alpha_{crit} = \arccos \frac{n_1}{n_2} \quad (11)$$

$\alpha_{crit}$ =kritischer Winkel der Totalreflexion

$n_1$ =Brechungsindex des optisch dünneren Mediums

$n_2$ =Brechungsindex des optisch dichteren Mediums

Der kritische Winkel der Totalreflexion von Röntgenstrahlen hängt folglich vom verwendeten Medium bzw. Trägermaterial ab. Eine Übersicht über kritische Winkel zur Totalreflexion unter

Verwendung unterschiedlicher Medien und Energien der Röntgenstrahlung ist in [132] zu finden.

Neben der externen Reflexion spielen im Rahmen der Totalreflexion die Reflektivität und die Eindringtiefe wichtige Rollen. Die Reflektivität lässt sich aus der Fresnel Formel [133] ableiten und stellt definitionsgemäß das Intensitätsverhältnis zwischen reflektiertem und einfallenden Strahl dar [133]. Die Eindringtiefe drückt per Definition die Tiefe aus, in die ein Strahl bei einem Intensitätsverlust von 37 % gegenüber seines Ausgangswertes in ein homogenes Medium eindringen kann [130,134]. Hierbei spielt der Einfallswinkel des Strahles eine wichtige Rolle, da bei abnehmendem Einfallswinkel die Eindringtiefe linear abnimmt [134]. Dieser Effekt wird bei der TXRF ausgenutzt, bei der wie in Abschnitt 2.4.1.2 beschrieben sehr kleine Einfallswinkel verwendet werden. Hierdurch werden die sonst üblichen Streuungen der Röntgenfluoreszenz (Compton- und Rayleigh-Streuung) minimiert und es resultiert ein geringeres Untergrundrauschen und somit ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber der XRF [40,130].

Genaueres zur Röntgenfluoreszenz und deren Totalreflexion, wie die Theorie der stehenden Wellen, ist ausführlich in [135] beschrieben und soll deshalb an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt werden.

### 2.4.1.3 Röntgenstrahler

Für die TXRF ist eine Röntgenquelle mit hoher Energie nötig. Diese Quelle besteht aus einem Hochspannungserzeuger (Generator) und dem eigentlichen Röntgenstrahler [136]. Der Röntgenstrahler besteht aus einer (Metallkeramik-) Röntgenröhre als Strahlungsquelle, dem Röhrentubus und dem Kühlkörper zur Positionierung und Wärmeableitung sowie zum Strahlenschutz und einem Röhrenhaus mit Lüfter zur Kühlung und weiterem Strahlenschutz [137]. Die eingesetzten Röntgenröhren können dabei aus unterschiedlichen Elementen (Gold, Wolfram, Silber, Molybdän, Kupfer, Cobalt, Eisen, Chrom) aufgebaut sein [136]. Der schematische Aufbau ist in [138] zu finden. Dabei liegt an einer Elektrode Hochspannung an und die Andere ist geerdet [136,137]. Inzwischen sind auch rotierende Anoden als Röntgenstrahler erhältlich, welche zu Röntgenstrahlung von deutlich höherer Intensität verglichen mit den üblichen Röntgenröhren führen, aber auch entsprechend teuer in der Anschaffung sind [139].

Es schließt sich die strahladaptierende Einheit (engl.: beam-adapting unit; Abb. 2-13, Ziffer 2) an, welche der richtigen Justierung der Röntgenstrahlen für die optimale Totalreflexion dient. Hierfür werden Quarzglasspiegel als Filter oder ein Multilayer aus schweren und leichten Elementen oder deren Verbindungen als Monochromator (und Breitbandfilter) eingesetzt [140,141]. Sie dienen als erste Reflektoren [142]. Auch Kombinationen aus Multilayer und Filtern aus Metallfolie oder Quarz werden verwendet [140,141]. An einem periodischen Multilayer wird die Monochromatisierung der Röntgenstrahlung durch die Bragg-Reflexion durchgeführt. Über die Bragg-Gleichung [143]:

$$2d \sin \alpha_m \approx m\lambda \quad (12)$$

*d=Abstand zweier Schichten des Multilayers*

*m=beliebige ganze Zahl*

*$\alpha_m$ =Einfallswinkel und Reflektion der Röntgenstrahlung*

*$\lambda$ =Wellenlänge der Röntgenstrahlung*



lässt sich feststellen, welche Strahlungsenergien bzw. Wellenlängen bei welchem Winkel gut reflektiert werden, sodass typische Winkel für die Reflexion unterschiedlicher Strahlungsquellen, bei gleichbleibendem Spaltmaß des Multilayers, ermittelt werden können [140,143]. Eine Übersicht über die Bragg-Winkel bei Verwendung unterschiedlicher Multilayer mit Molybdän-K $\alpha$ - und Wolfram-L $\beta$ -Strahlung ist in [144] präsentiert. Eine Anregung kann nur erfolgen, wenn die Energie der Anregungsstrahlung höher ist als die der Fluoreszenzlinie selbst [145]. Eine Charakterisierung erfolgt über die ionisierten Schalen (K-, L- oder M) und die auffüllenden Schalen ( $\alpha_{1...}$ ,  $\beta_{1...}$ , etc.) [145]. Durch das Vorschalten von Filtern kann der langwellige Anteil der Strahlung reflektiert werden, sodass nur noch der kurzwellige Anteil auf die Probe trifft. Hierdurch wird die Streuung der Strahlung reduziert, wodurch ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis erreicht wird [146].

#### 2.4.1.4 Probenträger

Die zu vermessenden Proben werden für die TXRF-Analyse auf speziell dafür gefertigte Träger (auch Discs genannt) aufgebracht. Diese können aus unterschiedlichen Materialien bestehen. Allen gemein ist ein Durchmesser von 30 mm bei einer Stärke von 3 mm und hoher chemischer Reinheit [147]. Die Einhaltung dieser Parameter ist nötig, damit Ergebnisse gleichbleibender Qualität erzielt werden können. Zumeist kommen Träger aus Quarz (siehe Abb. 2-15) zum Einsatz, aber auch solche aus Glaskohlenstoff und Saphir oder Einwegträger aus Plexiglas sind möglich [148]. Die eingesetzten Probenträger dienen als zweite Reflektoren unter dem streifenden Einfallswinkel der Röntgenstrahlung [142].



**Abb. 2-15 Quarzglas-Probenträger für TXRF-Messungen; Verwendung mit Erlaubnis der Bruker Nano GmbH**

Deutliche Unterschiede der verschiedenen Materialien zeigen sich bei deren Vermessung ohne Probe. So führt der Plexiglasträger schon durch seine Struktur selbst zu einem hohen spektralen Untergrund, sodass dieses Material für die Spurenanalytik weniger geeignet ist, wenn man nicht den Winkel der Totalreflexion am Messgerät verringern möchte. Quarzträger haben hingegen den Vorteil, dass sie verglichen mit Glaskohlenstoff und Saphir relativ günstig produziert werden können und trotz allem über eine gut zu reinigende Oberfläche bei einem geringen Untergrund verfügen [147]. Hiermit eignen sie sich im Gegensatz zu den Plexiglasträgern zur Spurenanalytik. Aus diesem Grund wurden die vorhandenen Plexiglaseinwegträger nur zu Beginn bei Vermessung höherer Konzentrationen verwendet und für alle weiteren Proben kamen Quarzträger zum Einsatz. Um eine möglichst geringe Fleckgröße zu erhalten, werden die Probenträger zumeist vor der Messung siliconisiert.

Hierdurch wird die Oberfläche hydrophobisiert und die Probe trocknet mit einem geringen Durchmesser auf der Scheibe, was für die Analyse vorteilhaft ist, da auf diese Weise die Empfindlichkeit erhöht wird [149].

### 2.4.1.5 Detektor

Alle verfügbaren TXRF-Spektrometer nutzen zur Detektion das Prinzip eines energiedispersiven Spektrometers, welches auf Grund seiner Schnelligkeit und Einfachheit dieser Technik noch keine Konkurrenz bekommen hat [150]. Bei dem darin enthaltenen Detektor handelt es sich um einen energiedispersiven Halbleiterdetektor, welcher üblicherweise aus reinen Silizium- oder Germaniumkristallen aufgebaut ist. Diese sind von dünnen Goldfolien umrahmt, welche als Elektroden fungieren [150]. Häufig werden auch Kristalle mit einem Lithiumzusatz eingesetzt. Hierbei wird den Silizium- oder Germaniumkristallen neben ihrer natürlichen Verunreinigung von Bor, welches als Akzeptor fungiert, noch zusätzlich Lithium als Donator zugefügt, welches unter Einfluss eines elektrischen Feldes „driftet“ [150]. Die auf diese Weise hergestellten Detektoren werden mit Si(Li) oder Ge(Li) gekennzeichnet und kommen sehr häufig zum Einsatz. Trifft ein Röntgenphoton auf einen solchen Kristall, entstehen einerseits Photoelektronen aber auch entsprechende Löcher. Die frei gewordenen Elektronen können bei genügend hoher Energie weitere Elektronen-Loch-Paare bilden, welche auf Grund der hohen angelegten Spannung separiert werden und getrennt in Richtung Anode und Kathode wandern [150]. Hierdurch wird ein Spannungsimpuls messbar, welcher proportional der Energie des den Vorgang auslösenden Röntgenphotons ist, wodurch die Energie des Photons messbar wird [150]. Eine schematische Darstellung findet sich in [151]. Inzwischen werden auch vermehrt sogenannte Silizium-Drift-Detektoren (SDD) verwendet. Diese verfügen über eine Driftkammer, in welcher der zuvor beschriebene Vorgang stattfindet. Schematische Abbildungen des Aufbaus finden sich in [152] und [153].

Als Ergebnis einer TXRF-Messung wird durch die Auswerteeinheit auf diese Weise ein energiedispersives Spektrum generiert, welches die Anzahl der gemessenen Photonen als Funktion ihrer Energie abbildet (vgl. Abschnitt 4.1.2.1) [150].

### 2.4.1.6 Quantifizierung mit TXRF

Die Quantifizierung mit der TXRF ist relativ einfach durchführbar, da anders als bei der üblichen Röntgenfluoreszenzspektrometrie nur primäre Anregungseffekte der in dünner Schicht aufgetragenen Probe erfolgen [122]. Somit sind die relativen Elementempfindlichkeiten von der Probe unabhängig, aber an das verwendete Gerät gekoppelt [122]. Voraussetzung um diesen Vorteil nutzen zu können, ist die vorab nötige Bestimmung des Verhältnisses der Empfindlichkeitsfaktoren. Dieses entspricht einer Kalibrierung des Gerätes, wobei einem beliebigen Element die Sensitivität eins zugeordnet wird und alle weiteren darauf bezogen werden. Die auf diese Weise bestimmbareren relativen Elementsensitivitäten gelten nur für die verwendete Gerätekonfiguration (Röntgenstrahler, Detektor, etc.) und werden häufig schon vom Hersteller bestimmt [154]. Dieses ermöglicht dann eine Quantifizierung über einen internen Standard.

Für alle Versuche wurde eine Quantifizierung nach der internen Standardisierung (vgl. Abschnitt 2.4.1.7) mit Mangan als internem Standard durchgeführt. Alternativ kann auch eine standardfreie oder absolute Quantifizierung erfolgen. Die standardfreie Quantifizierung wird häufig bei Vermessung von Legierungen verwendet. Wichtig ist hierbei, dass die Konzentration des nicht detektierten Probenanteils bekannt ist, sodass ein Rückschluss auf

die Masse des zu bestimmenden Elementes direkt möglich ist [154]. Die absolute Quantifizierung kommt üblicherweise bei sehr geringen Mengen eines Elementes zum Einsatz, wie sie beispielsweise bei Verunreinigungen einer Probe auftauchen. Hierbei ist die Kenntnis der absoluten Elementsensitivität für das zu bestimmende Element essentiell [154].

#### 2.4.1.7 Interne Standardisierung

Für die interne Standardisierung muss der zu vermessenden Probe ein interner Standard zugefügt werden. Wichtig ist hierbei, dass dieser in der eigentlichen Probe nicht enthalten ist [154], da sonst die Quantifizierung nicht eindeutig durchführbar ist. Aus diesem Grund werden meist Elemente gewählt, die nicht so weit verbreitet sind und auch nicht als Verunreinigungen in verwendeten Reagenzien vorkommen. Die Konzentration des betrachteten Elementes in der Probe wird nach Gleichung (13) bestimmt [155].

$$c_x = \frac{N_x/S_x}{N_{is}/S_{is}} \cdot c_{is} \quad (13)$$

$c_x$  = Konzentration des vermessenen Elementes

$c_{is}$  = Konzentration des internen Standards

$N_x$  bzw.  $N_{is}$  = Nettointensität des Analyten (x) bzw. des internen Standards (is)

$S_x$  bzw.  $S_{is}$  = relative Intensität des Analyten (x) bzw. des internen Standards (is)

## 2.5 Parameter zur Methodenvvalidierung nach ICH Q2(R1)

ICH ist die Abkürzung für "International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use" (deutsch: Internationale Konferenz für die Harmonisierung von technischen Anforderungen für die Registrierung von Arzneimitteln für den Gebrauch am Menschen). Diese wurde im Jahr 1990 von Aufsichtsbehörden und Firmen der pharmazeutischen Industrie aus der Europäischen Union, Japan und Amerika gegründet. Das Ziel war und ist es, die Aspekte der Arzneimittelentwicklung und -zulassung zu diskutieren und zu vereinheitlichen um weltweit bessere Arzneimittelsicherheit gewährleisten zu können [156]. Durch diese Vereinheitlichung sollen sichere, effektive und qualitativ hochwertige Medikamente für den Gebrauch am Menschen entwickelt werden. Aus diesem Grund wurden rechtsverbindliche Richtlinien (ICH-Guidelines) erarbeitet und herausgegeben. Je nach Themenkomplex wird zwischen: Q=Qualitätsrichtlinien (engl.: quality guidelines), S=Sicherheitsrichtlinien (engl.: safety guidelines), E=Wirksamkeitsrichtlinien (engl.: efficacy guidelines) und M=fachübergreifende Richtlinien (engl.: multidisciplinary guidelines) unterschieden [156]. Die nachfolgend in einzelnen Punkten vorgestellte Qualitätsrichtlinie Q2(R1) [157] gibt die Parameter vor, die zur Validierung einer analytischen Methode nötig sind. Für den routinemäßigen Einsatz eines Verfahrens ist eine Validierung unvermeidbar, da sie dem Verfahren seine Eignung für seinen vorgesehenen Zweck bescheinigt. Seit Inkrafttreten der Richtlinie 1995 werden die Nomenklatur und Definitionen der im Folgenden vorgestellten Parameter in Industrie und Behörden weltweit verwendet [158]. Die meisten der vorgestellten Parameter wurden für die Methodenentwicklung, sowohl bei den HPLC- als auch bei den TXRF-Methoden, überprüft.

### 2.5.1 Spezifität - Selektivität

Die Spezifität (engl.: specificity) gibt laut ICH definitionsgemäß die Möglichkeit eines Prüfverfahrens an, einen Analyten spezifisch neben weiteren Komponenten, wie beispielsweise Verunreinigungen, weiteren Wirkstoffen oder Matrixbestandteilen, zu bestimmen [157]. Häufig wird an Stelle der Spezifität der Begriff Selektivität (engl.:

selectivity) verwendet. Kromidas unterscheidet diese beiden Begriffe wie folgt: Spezifität gilt für richtige Ergebnisse eines Analyten mit der entsprechenden Methode, Selektivität hingegen gilt für die richtige Bestimmung aller Analyten mit der verwendeten Methode [159]. In diesem Punkt herrscht noch Uneinigkeit in der Harmonisierung, da sowohl IUPAC (=International Union of Pure and Applied Chemistry, Internationale Union für reine und angewandte Chemie) als auch WELAC (= Western European Laboratory Accreditation Cooperation, Westeuropäische Laborakkreditierungscooperation) laut Vessmann [160] eine andere Definition verwenden, bei der sie die Spezifität als den „ultimativen Grad der Selektivität“ bezeichnen. Unabhängig von der Bezeichnung sollten zur Prüfung dieses Parameters im Rahmen der Methodenvvalidierung in der pharmazeutischen Industrie Leerproben, Placebo, Referenzsubstanz, gestresste Referenzsubstanz und die eigentliche Probe untersucht werden [158]. Des Weiteren stellt die Selektivität die Grundvoraussetzung für die Richtigkeit (vgl. Abschnitt 2.5.4) einer Methode dar und sie wird herangezogen um die Güte von HPLC-Trennungen zu beurteilen [159]. In dieser Arbeit wird im Folgenden der Begriff Selektivität verwendet.

### 2.5.2 Linearität

Die Linearität (engl.: linearity) eines analytischen Verfahrens gibt per ICH-Definition dessen Möglichkeit an, einen direkt proportionalen Zusammenhang zwischen dem Messergebnis und der Konzentration des Analyten herzustellen, nachdem ein bestimmter Arbeitsbereich (vgl. Abschnitt 2.5.3) definiert wurde [157]. Die Linearität einer Methode wird üblicherweise über eine Kalibrierfunktion bestimmt, für die die ICH die Aufnahme von mindestens fünf Konzentrationen fordert. Ermer et al. [161] diskutieren hingegen, dass ein linearer Zusammenhang zwar vorteilhaft sei, aber nicht zwingend notwendig und plädieren für die Bezeichnung der „analytical response“ (=analytische Antwort) statt der Linearität.

### 2.5.3 Arbeitsbereich

Unter dem Arbeitsbereich eines analytischen Prüfverfahrens (engl.: range) wird, nach Definition der ICH, der Bereich zwischen höchster und niedrigster Konzentration des Analyten in der Probe verstanden. Für diesen Bereich musste gezeigt werden, dass das Verfahren über ein ausreichendes Maß an Linearität (vgl. Abschnitt 2.5.2), Präzision (vgl. Abschnitt 2.5.5) und Richtigkeit (vgl. Abschnitt 2.5.4) verfügt [157]. Es besteht eine direkte Abhängigkeit von der Präzision der Methode, da sich hieraus Kriterien für die Linearität und somit auch für den Arbeitsbereich ableiten lassen [162].

### 2.5.4 Richtigkeit

Die Richtigkeit (engl.: accuracy oder auch trueness) drückt per ICH-Definition die Übereinstimmung eines bei einem analytischen Verfahren ermittelten Wertes mit dem wahren Wert bzw. einem akzeptierten Referenzwert aus. Üblicherweise wird die Richtigkeit als Wiederfindungsrate (*WFR* %) in Prozent angegeben. Diese berechnet sich wie folgt [163]:

$$WFR \% = \frac{\bar{x}}{\mu} \cdot 100 \quad (14)$$

$\bar{x}$ =Mittelwert der Einzelmesswerte  
 $\mu$ =richtiger Wert (Soll-Wert)

Zur Ermittlung der Richtigkeit einer Methode sind verschiedene Ansätze möglich. Gefordert wird allerdings für alle Ansätze ein Minimum von neun Messungen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen [157]. Eine hohe Wiederfindungsrate deutet darauf hin, dass während der Probenvorbereitung und den unterschiedlichen Messungen keine oder nur wenig Fehler aufgetreten sind. Sie gibt insofern Auskunft über die Selektivität, Richtigkeit und Robustheit einer Methode, was aber nur für die direkt angewendeten experimentellen Bedingungen gilt [164] und nicht ohne weiteres auf andere Proben übertragen werden kann.

### 2.5.5 Präzision

Die Präzision (engl.: precision) eines analytischen Prüfverfahrens drückt die Übereinstimmung verschiedener Messungen mehrerer Stichproben, die aus einer gleichen Probe unter vorgegebenen Bedingungen gezogen wurden, aus [157]. Sie ermöglicht eine Aussage über eine Methode und deren Streuung [165]. Die Präzision wird in Form der absoluten Standardabweichung  $s$ :

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (15)$$

$x_i$ =Einzelwerte der Bestimmungen  
 $\bar{x}$ =Mittelwert der Einzelmesswerte  
 $n$ =Anzahl der Bestimmungen

der relativen Standardabweichung  $RSD$  %:

$$RSD \% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (16)$$

$s$ =absolute Standardabweichung  
 $\bar{x}$ =Mittelwert der Einzelmesswerte

oder in Form der Varianz ( $s^2$ ) angegeben, welche die quadrierte Standardabweichung ist [166]. Die symbolischen Bezeichnungen der einzelnen Standardabweichungen variieren, sodass je nach Literatur die absolute Standardabweichung auch als  $\sigma$  [167] oder zur Kennzeichnung der Standardabweichung einer Stichprobe als  $\hat{\sigma}$  [168] gekennzeichnet werden. Auch für die relative Standardabweichung existieren verschiedene Nomenklaturen. Diese wird am häufigsten zur Angabe der Präzision verwendet und eignet sich im Gegensatz zur absoluten Standardabweichung zum Vergleich der Präzision unterschiedlicher Methoden [169]. Der Grund dafür ist, dass die relative Standardabweichung als dimensionslose Größe die Streuung vom Mittelwert angibt, wohingegen die absolute Standardabweichung von der Größe der betrachteten Werte abhängt, sodass bei größeren Werten höhere Standardabweichungen erhalten werden [170]. Deshalb wird in dieser Arbeit die relative Standardabweichung als Maß für die Präzision verwendet.

Man unterscheidet im Rahmen der Methodvalidierung zwischen verschiedenen Präzisionsebenen, welche schematisch in Abb. 2-16 dargestellt sind.

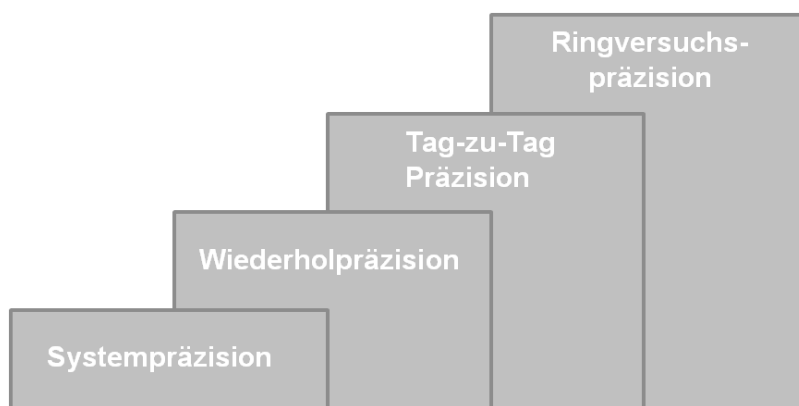


Abb. 2-16 verschiedene Präzisionsebenen; modifiziert nach [171]; erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup>

Die niedrigste von der ICH in der Vorschrift Q2(R1) genannte Ebene ist die Wiederholpräzision (engl.: repeatability) [157]. Zu ihrer Bestimmung wird eine Probe mehrfach unter identischen Bedingungen von einem einzigen Analytiker vorbereitet und mit derselben Methode an demselben Gerät innerhalb eines kurzen Zeitraumes vermessen. Der Vollständigkeit halber sollte dieser, wie von Ermer [171] vorgeschlagen, allerdings noch eine niedrigere Stufe unterstellt werden. Dieses ist die System- oder Instrumentenpräzision (engl.: system or instrument precision), welche auch von Limberg [158] gefordert wird und deshalb ebenfalls in Abb. 2-16 aufgeführt ist. Diese wird durch Mehrfachinjektion einer Probe bestimmt, sodass nur geringe Variationsparameter, die durch das Analyseinstrument hervorgerufen werden, wie beispielsweise die Detektion oder Integration, einen Einfluss haben. Das Europäische Arzneibuch hingegen definiert diese als die Wiederholpräzision bei der mehrere Injektionen aus einer Probe betrachtet werden [83]. Die dritte Stufe stellt die Tag-zu-Tag- oder auch Mehrtagespräzision bzw. –standardabweichung (engl.: intermediate precision) dar. Diese wird erreicht, indem die Versuche zur Wiederholpräzision entweder an verschiedenen Tagen oder von verschiedenen Analytikern oder an unterschiedlichen Geräten durchgeführt werden [157,172]. Hierbei wird der Einfluss des veränderten Parameters überprüft. Die ICH-Vorschrift empfiehlt diesbezüglich ein genaues Versuchsdesign. Die höchste Präzisionsebene, die Vergleichspräzision oder Ringversuchspräzision (engl.: reproducibility), wird durch Anwendung derselben Methode in unterschiedlichen Laboren ermittelt, wodurch automatisch weitere Einflüsse auf die Präzision überprüft werden [157]. Generell kann gesagt werden, dass die Standardabweichung normalerweise von Stufe zu Stufe zunimmt – die Präzision folglich immer schlechter wird, da bei den Testungen immer mehr Einflussparameter mit einbezogen werden.

Um eine gemeinsame Auswertung der Daten zur Wiederholpräzision zu ermöglichen [158] wurden die Werte der einzelnen Tage nach folgender Formel gepoolt ( $RSD \%_{pooled}$ ) [173,174]:

$$RSD \%_{pooled} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n df_i \cdot RSD \%_i^2}{\sum_{i=1}^n df_i}} \quad (17)$$

$f$ =Anzahl der Freiheitsgrade

$RSD \%$ =relative Standardabweichung

Während dieser Arbeit wurden die Wiederhol- und die Tag-zu-Tag Präzision überprüft und für die Vergleiche der einzelnen Methoden herangezogen.

### 2.5.6 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (engl.: limit of detection, *LOD*) ist definiert als die niedrigste noch detektierbare bzw. nachweisbare Menge eines Analyten in einer Probe mit dem verwendeten analytischen Verfahren. Hierbei kann jedoch keine Quantifizierung mehr durchgeführt werden.

Es sind laut der Richtlinie verschiedene Ansätze zur Ermittlung der Nachweisgrenze zulässig. Möglich ist beispielsweise eine visuelle Auswertung, die allerdings für nicht-instrumentelle Methoden zu bevorzugen und nicht so aussagekräftig ist, da sie sehr subjektiv ist. Weiterhin ist eine Auswertung basierend auf der Standardabweichung und der Steigung der Kalibriergeraden nach der folgenden Gleichung [157] möglich:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad (18)$$

$\sigma$  = Standardabweichung des Messsignals  
 $S$  = Steigung der Kalibrierfunktion

Das sowohl vom Europäischen Arzneibuch [83] als auch vom Amerikanischen Arzneibuch (engl.: United States Pharmacopoeia, USP) [175] verwendete Verfahren, welches auch in dieser Arbeit Anwendung fand, ist die Bestimmung der *LOD* basierend auf dem Signal-Rausch-Verhältnis. Dieses wird an Hand der Vorgaben der Arzneibücher ermittelt (vgl. Abschnitt 2.2.6) und die Detektionsgrenze gilt bei einem S/N-Verhältnis von 3 als erreicht. Hierbei ist es wichtig, dass kein Drift der Basislinie während der Messung vorhanden ist [176]. Weitere mögliche Ansätze können der ICH-Vorschrift [157] entnommen werden.

### 2.5.7 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze (engl.: limit of quantitation, *LOQ*) eines analytischen Verfahrens gibt, laut ICH-Definition, die kleinste quantifizierbare Menge eines Analyten in einer Probe an, die mit ausreichender Präzision (vgl. Abschnitt 2.5.5) und Richtigkeit (vgl. Abschnitt 2.5.4) ermittelt werden kann.

Die Bestimmungsgrenze kann ebenso wie die Nachweisgrenze (vgl. Abschnitt 2.5.6) über mehrere Methoden ermittelt werden. So kann die *LOQ* analog, basierend auf der Standardabweichung und der Steigung der Kalibrierfunktion, mit Hilfe folgender Formel [157] bestimmt werden:

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (19)$$

$\sigma$  = Standardabweichung des Messsignals  
 $S$  = Steigung der Kalibrierfunktion

Wie auch bei der Ermittlung der *LOD* wird für die Bestimmungsgrenze von den Arzneibüchern [83,175] der Ansatz basierend auf dem Signal-Rausch-Verhältnis verfolgt. So gilt die *LOQ* bei einem S/N-Verhältnis von 10 als erreicht. Somit ist eine Quantifizierung bei S/N-Werten  $\geq 10$  möglich, was auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Trotzdem verschiedene Ansätze zur Ermittlung von *LOQ* (und auch *LOD*) existieren, sollten diese lt. Ermer et al. [177] zu vergleichbaren Ergebnissen führen, sodass die Art der Ermittlung nur eine geringe Rolle spielen sollte.

### **2.5.8 Robustheit**

Die Robustheit (engl.: robustness) gibt per Definition Auskunft darüber, wie empfindlich ein analytisches Verfahren gegenüber kleinen, bewusst vorgenommenen Änderungen der Messbedingungen ist [157]. Hierbei werden bei HPLC-Analysen oft Änderungen der Zusammensetzung der mobilen Phase, des pH-Wertes oder der Flussrate überprüft [157]. Bei anderen Verfahren, wie der TXRF, werden beispielsweise die Trocknungsbedingungen oder die Probenaufgabe variiert. Eine Übersicht über weitere Variationsmöglichkeiten verschiedener Techniken findet sich in [178] und [179].

Die Ergebnisse, die unter diesen variierenden Bedingungen erzielt wurden, sollten und dürfen sich nicht signifikant von den unter typischen Versuchsbedingungen erzielten unterscheiden. Somit wird über die Robustheit eine Aussage über die Verlässlichkeit des verwendeten Verfahrens möglich [158]. Zumeist wird hierfür ein Bereich angegeben in dem die Methode die Kriterien der Robustheit erfüllt [180].



### 3 Proteinquantifizierung mit Hilfe der HPLC

Der Anteil von auf Proteinen basierenden Arzneistoffen am Arzneimittelmarkt nimmt immer mehr zu. So machten Biopharmazeutika (engl.: biologicals) im Jahre 2010 einen Marktanteil von 17 % am Gesamtpharmamarkt aus [17]. Sogenannte biologicals, wie beispielsweise monoklonale Antikörper, werden vermehrt zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder auch bei unterschiedlichen Krebsarten eingesetzt [19–21]. Auch die Anzahl registrierter Biopharmazeutika und solcher, die sich in der Entwicklung befinden, steigt stetig [18,181]. Da es sich bei Biopharmazeutika zumeist um sehr potente Arzneistoffe handelt, die zudem wie alle anderen Proteine dazu neigen Aggregate zu bilden, ist es sehr wichtig über präzise und selektive Methoden zur Proteinbestimmung zu verfügen. Diese Methoden sind für alle Stufen des Herstellungsprozess des Biopharmazeutikums nötig und dienen nicht nur der Identifizierung des Wirkstoffes sowie Nebenkomponenten, sondern auch deren Quantifizierung. Da monoklonale Antikörper aber um etwa Faktor 1000 größer sind als klassische chemische Wirkstoffe, sind die Unterschiede innerhalb den Biopharmazeutika deutlich größer, da sie über vielfältige Modifikationen, wie z.B. Oxidationsprodukte, verfügen können [182]. Diesen Eigenschaften gilt es mit der nötigen Analytik gerecht zu werden und die Methodenentwicklung stellt sich demzufolge komplizierter dar.

Um eine gleichbleibende Arzneimittelqualität zu gewährleisten, fordern die zuständigen Behörden (in Deutschland das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM) validierte Methoden, welche zumeist in Anlehnung an die ICH-Richtlinie Q2(R1) geprüft werden (vgl. Abschnitt 2.5). Viele verbreitete Analysenmethoden zur qualitativen und quantitativen Proteinbestimmung erfüllen jedoch nicht die nötigen Anforderungen für die Qualitätskontrolle [28]. So reichen die Bestimmungsgrenze und die niedrige Präzision des Bradford Assays oder der Gelelektrophorese beispielsweise hierfür nicht aus, weshalb nach Alternativen gesucht werden muss [29]. Auf Grund ihrer hohen Selektivität rückt die Massenspektrometrie zur Proteinanalyse immer mehr in den Fokus [30,31]. Hierfür sind jedoch teures Equipment und eine aufwendige Probenvorbereitung, sowie eine Kopplung mit einer Trenntechnik, meist der HPLC, nötig. Dieses zeigt allerdings, dass die HPLC generell über die Leistungsfähigkeit zur Proteinanalyse und –trennung verfügt, sodass der Schluss nahe liegt eine Proteinquantifizierung mit dieser Technik anzustreben. Der Grundstein dieses Projektes wurde von Dr. Lukas Kaminski im Rahmen seiner Dissertation [183] mit der Arbeit zur „Quantitativen Größenausschlusschromatographie“ gelegt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll nun gezeigt werden, dass eine Quantifizierung nicht nur mit der Größenausschlusschromatographie, sondern auch mit anderen Trennmechanismen der HPLC möglich ist und diese anschließend untereinander zu vergleichen.

Bei der Methodenentwicklung für die Modellproteine mit den einzelnen Trennmechanismen wurde das Hauptaugenmerk auf die Praktikabilität gelegt. Viele Parameter wurden im Rahmen der Methodenentwicklung überprüft und getestet, aber es wurden nicht alle Optimierungsmöglichkeiten ausgeschöpft, sodass bei Bedarf gegebenenfalls noch Verbesserungen möglich sind. Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass eine Proteinquantifizierung mit der HPLC im Rahmen des Möglichen liegt und verschiedene Trennmechanismen bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit für diesen Ansatz zu vergleichen. Wie schon Tabelle 2-1 in Abschnitt 2.1.2 zeigt, gibt es einige Trennmechanismen, die für die HPLC-Analytik von Proteinen in Frage kommen. Eine Auswahl der getesteten und zum Vergleich mit herangezogenen Trennmechanismen wurde getroffen nach einer Recherche,

der häufig (auch in der pharmazeutischen Industrie) eingesetzten Trennmechanismen. Hierbei wurden die damals relativ neuen Trennmechanismen wie HILIC und HIC außer Acht gelassen, da sie sich derzeit noch nicht so sehr in der pharmazeutischen Industrie bewährt hatten. Um einen abschließenden Vergleich der unterschiedlichen Trennmechanismen zu ermöglichen, wurden in allen verwendeten Trennmechanismen Trennungen mit den gleichen Modellproteinen und in einem zweiten Schritt auch mit einem monoklonalen Antikörper und seinen Begleitkomponenten angestrebt. Die Wahl der Modellproteine richtete sich nach ihren Eigenschaften, wie der molaren Masse und den isoelektrischen Punkten, sodass eine Trennung zwar möglich sein sollte, aber nicht zu einfach. Die Zugänglichkeit und die Anschaffungskosten waren ein weiterer Aspekt in dieser Betrachtung. Vanecek und Regnier bezeichneten schon 1980 Ovalbumin und Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin, BSA) als ideale Proteine um die Trennbedingungen zu optimieren und Trennsäulen miteinander zu vergleichen [184], sodass der Einsatz dieser beiden als sinnvoll erschien. Beide verfügen über einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich [100], sodass hier sinnvollerweise noch ein Protein mit einem höheren  $pI$  ergänzt wurde. Die Wahl fiel in diesem Fall auf Myoglobin mit einem isoelektrischen Punkt im neutralen Bereich und einer kleineren Molekülgröße von 17 kDa verglichen mit Ovalbumin (45 kDa) und BSA (66 kDa) [100].

Da eine präzise und selektive Methode essentiell für die nachfolgende Proteinquantifizierung ist, wird für jeden verwendeten Trennmechanismus zunächst die Methodenentwicklung, getrennt für Modellproteine und monoklonalen Antikörper, vorgestellt und anschließend die erreichten Präzisionsdaten mit Bewertung präsentiert. Im Anschluss erfolgt der Vergleich der unterschiedlichen eingesetzten Trennmechanismen.

## 3.1 Anionenaustauschchromatographie

Die Hochleistungs(starke)anionenaustauschchromatographie (engl.: high performance strong anion exchange chromatography; HP-SAX) wird schon seit vielen Jahren für die Proteinanalytik eingesetzt [185]. Durch ihren amphoteren Aufbau reagieren die Proteine sehr empfindlich auf pH-Wert-Änderungen, was einen direkten Einfluss auf deren Elutionsverhalten in der Ionenaustauschchromatographie hat. Aus diesem Grund spielt der gewählte pH-Wert der mobilen Phase während der Methodenentwicklung eine essentielle Rolle, was schon 1985 von Kopaciewicz et al. [186] bei der Entwicklung eines Retentionsmechanismus für die Anionenaustauschchromatographie evaluiert wurde und auch noch heute bedacht werden muss. Durch den Einsatz einer monolithischen Trennsäule in diesem Trennmechanismus waren höhere Flussraten und somit auch schnellere Trennungen im Vergleich mit gepackten Säulen möglich [187–189]. In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, dass die Anionenaustauschchromatographie nicht nur für Proteintrennungen oder –aufreinigungen [190,191] geeignet ist, sondern auch für die Proteinquantifizierung.

### 3.1.1 Methodenentwicklung Modellproteine

Die ersten Versuche mit dem starken Anionenaustauscher wurden mit Myoglobin und  $\beta$ -Casein als Modellproteine nach einer Standardmethode vom Säulenhersteller Dionex [192] von Dr. Sami El Deeb im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes an der TU Braunschweig durchgeführt. An die hierbei erzielten Ergebnisse schloss sich die weitere Methodenentwicklung an.

### 3.1.2 Myoglobin und $\beta$ -Casein

Nachdem von Dr. El Deeb schon eine Optimierung der Herstellermethode durch Anpassung von Flussrate und Injektionsvolumen erfolgte, wurden mit derselben Methode, aber unterschiedlichen Proteinkonzentrationen noch einige Läufe zur Präzisionsbestimmung durchgeführt. Ein beispielhaftes Chromatogramm ist in Abb. 3-1 dargestellt, woraus die deutliche Basislinientrennung der zwei Proteine ersichtlich ist. Dieses lässt darauf schließen, dass hier noch eine weitere Methodenoptimierung möglich wäre, sei es durch eine höhere Flussrate oder durch einen veränderten Gradienten, bei dem die Ionenstärke schneller erhöht wird. Beides würde theoretisch zu einer schnelleren Elution des  $\beta$ -Caseins führen.

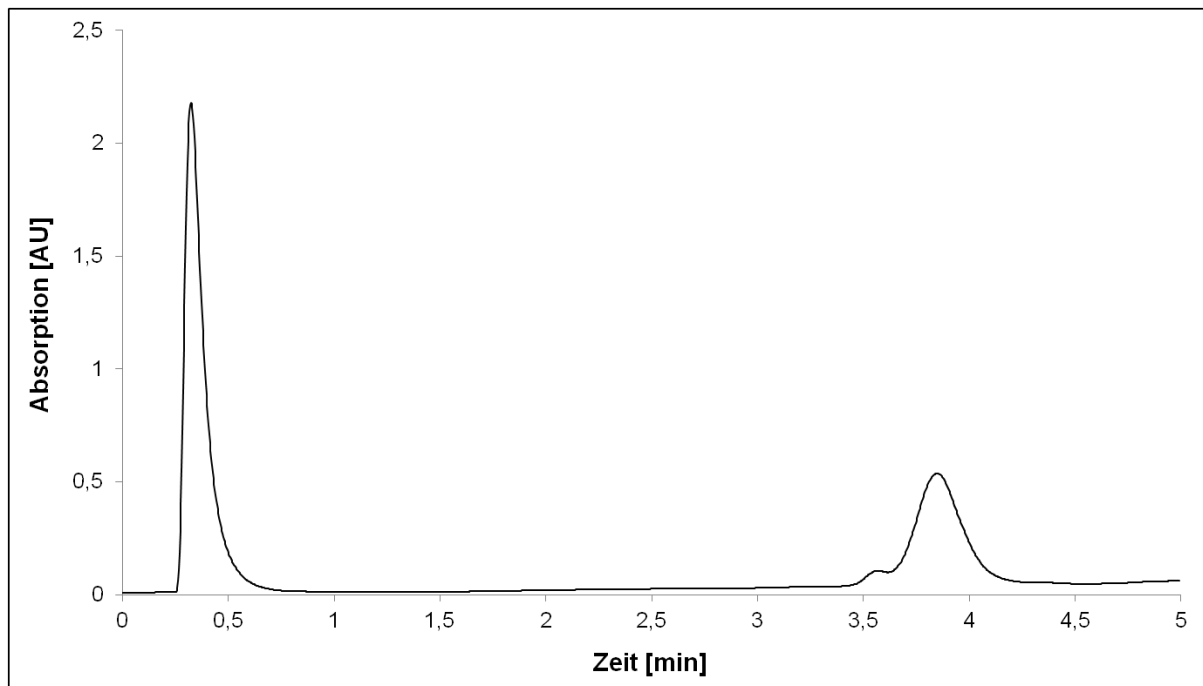


Abb. 3-1 Repräsentatives Chromatogramm der Trennung von Myoglobin ( $t_R=0,323$  min) und  $\beta$ -Casein ( $t_R=3,83$  min) mit je 1 mg/ml; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.1

Da allerdings für den abschließenden Vergleich der unterschiedlichen Trennmechanismen eine Methode zur Trennung von drei Modellproteinen angestrebt wurde, wurde an dieser Stelle die Trennung von Myoglobin und  $\beta$ -Casein nicht weiter optimiert.

#### 3.1.2.1 Präzision der SAX-Trennung von Myoglobin und $\beta$ -Casein

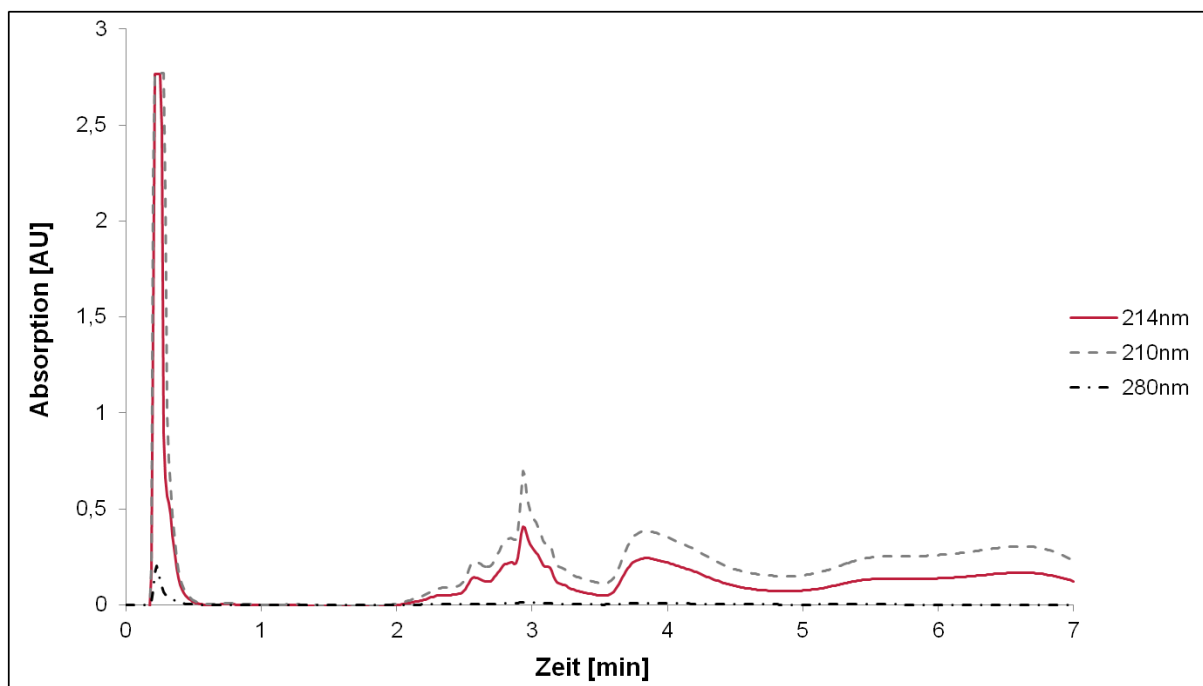
Nachdem eine Basislinientrennung von Myoglobin und  $\beta$ -Casein erreicht werden konnte, wurden kurze Serien vermessen, um einen Eindruck über die Präzision der Methode zu gewinnen. Neben einer guten Präzision für die Retentionszeiten beider Proteine, ausgedrückt in der relativen Standardabweichung ( $RSD \% < 0,5 \%$ ), konnte für die Peakflächen von Myoglobin nach dem Poolen der Ergebnisse aus drei Serien mit  $n=6/5/3$  eine relative Standardabweichung von 0,660 % erreicht werden. Für die Peakflächen von  $\beta$ -Casein wurde für dieselben Serien mit  $n=6/5/3$  eine relative Standardabweichung von 2,34 % erreicht. Diese Ergebnisse waren vielversprechend, vor allem das Myoglobin betreffend.

### 3.1.3 Myoglobin, Ovalbumin und Bovines Serum Albumin

Um die SAX besser mit den anderen Trennmechanismen vergleichen zu können und um zu zeigen, dass eine Trennung von drei Modellproteinen möglich ist, wurde  $\beta$ -Casein durch Ovalbumin und Rinderserumalbumin ersetzt. Hierdurch wurde ein Trennproblem konstruiert,

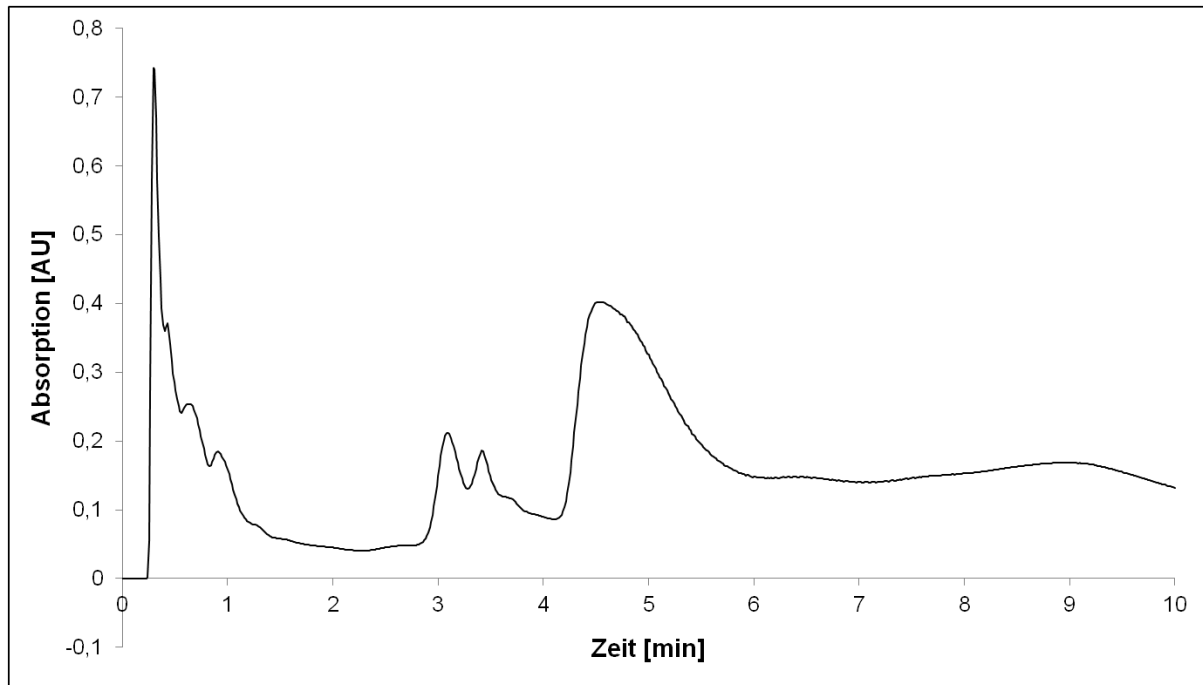
welches auf Grund der ähnlichen isoelektrischen Punkte von Ovalbumin ( $pI=4,9$ ) und BSA ( $pI=4,2-4,9$ ) nicht leicht zu lösen schien.

Zunächst wurde mit den zuvor für Myoglobin und  $\beta$ -Casein verwendeten Bedingungen gearbeitet. Hierdurch konnte eine akzeptable Trennung aller drei Modellproteine erreicht werden (Abb. 3-2). Eine Identifizierung der einzelnen Proteine wurde durch Einzelmessungen vorgenommen. Abb. 3-2 zeigt weiterhin die Messung derselben Probe bei unterschiedlichen Wellenlängen. Aus diesem Vergleich wird ersichtlich, dass bei 280 nm, bedingt durch geringere molare Absorptionskoeffizienten bei dieser Wellenlänge, kaum eine Absorption erkennbar ist. Bei 210 nm war ein höherer Anstieg der Basislinie nach der eigentlichen Messung (nach 5 min) als bei 214 nm erkennbar, weil bei dieser Wellenlänge üblicherweise mehr unerwünschte Störungen erfasst werden. Aus diesem Grund wurden die folgenden Messungen mit einer Detektionswellenlänge von 214 nm durchgeführt.



**Abb. 3-2** Übereinander gelegte Chromatogramme bei unterschiedlichen Wellenlängen (siehe Legende) der Trennung von Myoglobin ( $t_R=0,227$  min), Ovalbumin ( $t_R=2,95$  min) und BSA ( $t_R=3,83$  min) in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,6 zur Identifizierung der besten Detektionswellenlänge; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2

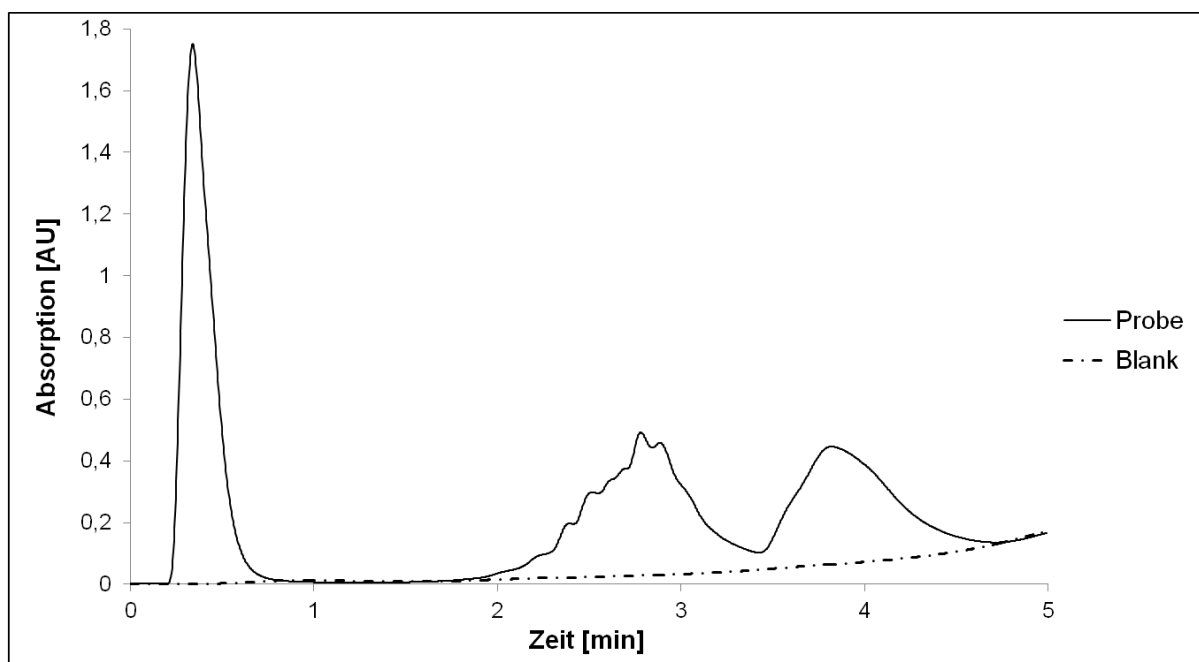
Da der Myoglobinpeak in Abb. 3-2 nicht vollständig detektiert werden konnte, wurde die Myoglobinkonzentration von 1 mg/ml auf 0,5 mg/ml für die folgenden Läufe reduziert. Bei Mehrfachinjektionen aus einer Probe zeigte sich jedoch nach und nach, dass die Methode nur eingeschränkt reproduzierbar war. Wie in Abb. 3-3 gezeigt, tauchte das Problem auf, dass Ovalbumin nicht mehr als Einzelpeak wie in Abb. 3-2 detektierbar war. Stattdessen wurden sieben „Peaks“ für das Ovalbumin detektiert, die auch teilweise den absteigenden Ast des Myoglobinpeaks überlappten. Diese Problematik wurde in mehreren Läufen in ähnlicher Weise aber unter gleichen Bedingungen beobachtet, sodass es sich hierbei nicht um eine Ausnahme handeln konnte.



**Abb. 3-3 zeigt das aufgetretene „Ovalbuminproblem“ bei der Trennung von Myoglobin ( $t_R=0,293$  min), Ovalbumin ( $t_{R1}=0,427$  min,  $t_{R2}=0,613$  min,  $t_{R3}=0,907$  min,  $t_{R4}=1,25$ ,  $t_{R5}=3,07$  min,  $t_{R6}=3,41$  min und  $t_{R7}=3,69$  min) und BSA ( $t_R=4,57$  min) in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,6; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2**

Folglich bedurfte die Methode noch einiger Optimierung um neben der Selektivität auch eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen. Hierfür wurde die Ionenstärke des Startpuffers auf 20 mM angehoben, um dessen Pufferkapazität und pH-Stabilität zu erhöhen und um Wechselwirkungen zwischen den Proteinen zu vermeiden [79]. Es schlossen sich theoretische Überlegungen zur Elutionsreihenfolge der Proteine bei dem verwendeten pH-Wert von 7,6 an, um hierdurch eine Optimierung zu erlangen. Myoglobin eluiert bei dem verwendeten pH-Wert von 7,6 sehr früh, was darauf schließen lässt, dass es nur wenig bis gar keine Wechselwirkungen mit dem starken Anionenaustauscher eingeht, obwohl der pH-Wert über dessen isoelektrischen Punkt liegt. Dieses müsste theoretisch zu einer negativen Nettoladung des Proteins führen und somit Wechselwirkungen mit der Trennsäule ermöglichen. Dumetz et al. gehen bei einem pH-Wert von 7,0 von einer einfach positiven Nettoladung des Myoglobins aus [100], was entgegen der Theorie die frühe Elution bestätigt. BSA und Ovalbumin hingegen verfügen bei einem pH-Wert von 7,0 und dementsprechend auch bei 7,6 lt. Dumetz et al. schon über eine deutlich negative Nettoladung, sodass hier eine Wechselwirkung mit der Anionenaustauschersäule möglich ist. Dieses zeigt sich auch in der späteren Elution der beiden Proteine. Folglich musste der pH-Wert erhöht werden um ggf. eine spätere Elution von Myoglobin zu erreichen. Ein noch wichtigerer Aspekt des höheren pH-Wertes ist die erhöhte Stabilität des Ovalbumins. Vanecek und Regnier haben schon 1980 Trennungen von Ovalbumin und BSA bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt und bezeichnen Ovalbumin und BSA als ideale Proben um die Trennbedingungen zu optimieren und Trennsäulen miteinander zu vergleichen [184]. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Analysen der gleichen Modellproteine ein pH-Wert von 8,6 verwendet, aber die sonstigen Parameter beibehalten. Ein repräsentatives Chromatogramm zeigt Abb. 3-4. Erkennbar ist hierbei, dass Myoglobin (Peak 1,  $t_R=0,341$  min) nicht wesentlich später eluiert als zuvor, aber immer noch über die gewünschte schmale Peakform verfügt. Ovalbumin (Peak 2,  $t_R=2,78$  min) und BSA (Peak 3,  $t_R=3,81$  min) konnten basisliniengetreunt werden

und obwohl die Peakform von Ovalbumin auf den ersten Blick nicht allzu regelmäßig schien, zeigte sie sich als sehr reproduzierbar. Das dargestellte Chromatogramm zeigt einen Anstieg der Basislinie, welcher sich auch in der dargestellten Blankinjektion (schwarze gestrichelte Kurve) zeigt. Das Amerikanische Arzneibuch (engl.: United States Pharmacopoeia, USP) hingegen schreibt hierfür eine Injektion des Fließmittels vor [175]. Abweichend davon wurde in dieser Arbeit bei einem Blank nichts injiziert, aber dieselbe Methode unter denselben Bedingungen durchgeführt, wie bei einer Probenmessung. Blanks werden häufig durchgeführt, um identifizieren zu können ob Schwankungen der Basislinie durch die Probe oder schon die eigentliche Methode, wie hier den angewendeten Gradienten, bedingt sind. In diesem Fall ist der Anstieg der Basislinie bedingt durch die Zunahme der Chloridkonzentration im Verlauf des Gradienten, da sich in dem Eluenten B Natriumchlorid zur Erhöhung der Ionenstärke befindet und dieses in höheren Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 214 nm absorbiert [193].



**Abb. 3-4** Repräsentatives Chromatogramm der Trennung von Myoglobin ( $t_R=0,341$  min), Ovalbumin ( $t_R=2,78$  min) und BSA ( $t_R=3,81$  min) mit der entwickelten Methode in 20 mM Tris-HCl Puffer pH 8,6 und zugehörigem Blanklauf bei gleichen Bedingungen um den Anstieg der Basislinie durch die gradientenbedingte Chloridzunahme zu präsentieren; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2

#### 3.1.3.1 Präzision der SAX-Trennung von Myoglobin, Ovalbumin und BSA

Nachdem in kurzen Messserien ( $n=10$ ) eine vielversprechende Präzision von Retentionszeiten und Peakflächen erreicht werden konnte, wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen drei Serien von  $n=20$  (verteilt auf zwei Vials) vermessen, die Ergebnisse für die Wiederholpräzision gepoolt und anschließend die Tag-zu-Tag Präzision errechnet (Tab. 3-1).

**Tab. 3-1 Präzisionsdaten der Peakflächen und Bestimmungsgrenze (LOQ) der einzelnen Proteine mit der entwickelten SAX-Methode (Genauerer zur Ermittlung der LOQ in Abschnitt 3.1.3.2)**

	<b>Wiederholpräzision Fläche<sub>pooled</sub> (RSD% n=20)</b>	<b>Tag-zu-Tag Präzision Fläche (RSD% n=60)</b>	<b>LOQ</b>
<b>Myoglobin</b>	0,784	1,41	<15 µg/ml
<b>Ovalbumin</b>	1,90	4,91	<15 µg/ml
<b>BSA</b>	3,21	4,97	<15 µg/ml

Die Werte für Myoglobin sind sowohl für die Wiederholpräzision mit < 1 % als auch für die Tag-zu-Tag Präzision mit < 2 % für die angestrebte Qualitätskontrolle, mit der Forderung von < 2 % relativer Standardabweichung, geeignet [28]. Die Werte von Ovalbumin und BSA liegen mit knapp unter fünf Prozent für die Tag-zu-Tag Standardabweichung etwas höher. An dieser Stelle muss allerdings erwähnt werden, dass die Peakform von Myoglobin deutlich vorteilhafter für eine exakte Integration ist, als die von Ovalbumin und BSA, was auch einer schlechteren Präzision der beiden letzteren zu schulden ist. Auch wenn für Ovalbumin und BSA die „magische Grenze“ von zwei Prozent für die Qualitätskontrolle nicht erreicht werden konnte, sind dieses doch recht passable Werte und die erreichte Präzision von Myoglobin zeigt, dass generell die Möglichkeit besteht eine Präzision von unter zwei Prozent mit der Anionenaustauschchromatographie, insbesondere dem hier verwendeten starken Anionenaustauscher, zu erreichen. Auch die Tag-zu-Tag Präzision der Retentionszeiten mit 0,93 % für Myoglobin deutet daraufhin. Für Ovalbumin und BSA wurden mit 2,81 % und 1,70 % auch, wie bei der Präzision der Peakflächen, etwas höhere Werte erhalten.

### 3.1.3.2 Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Da durch Verwendung des Salzgradienten ein starker Anstieg der Basislinie auftrat (vgl. Abschnitt 3.1.3 und 3.4.1.2 – Charakteristische Basislinien), war es bei den niedrigen Konzentrationen zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze nicht ganz einfach zu erkennen, ob wirklich genug Substanz zur Analyse vorlag (siehe Abb. 3-5, schwarz-gestrichelte Linie). Bei einer Retentionszeit von etwa drei Minuten und einer Retentionszeit von etwa 4,5 Minuten sind hier kaum noch Peaks erkennbar. Problematisch ist an diesen Stellen auch eine exakte Integration.

Aus diesem Grund wurde bei diesen niedrigen Konzentrationen nun nach jeder Probeninjektion ein Blanklauf durchgeführt (in Abb. 3-5 die hellgrau-gestrichelte Kurve). Dies zeigte, dass die Basislinie reproduzierbar den dargestellten Anstieg zeigte, sodass zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze eine Rechenoperation durchgeführt wurde, bei der die UV-Rohdaten des Blanklaufes von den UV-Rohdaten der Probeninjektion abgezogen wurden. Das resultierende Chromatogramm (hier die rote Kurve) wies nun wieder deutlich erkennbare Peaks auf, die eine einheitliche und sinnvolle Integration ermöglichten, sodass die Ermittlung der Bestimmungsgrenze zwar ein wenig umständlich, aber möglich war. Auf diese Weise wurde eine Bestimmungsgrenze für alle drei Proteine von <15 µg/ml ermittelt.

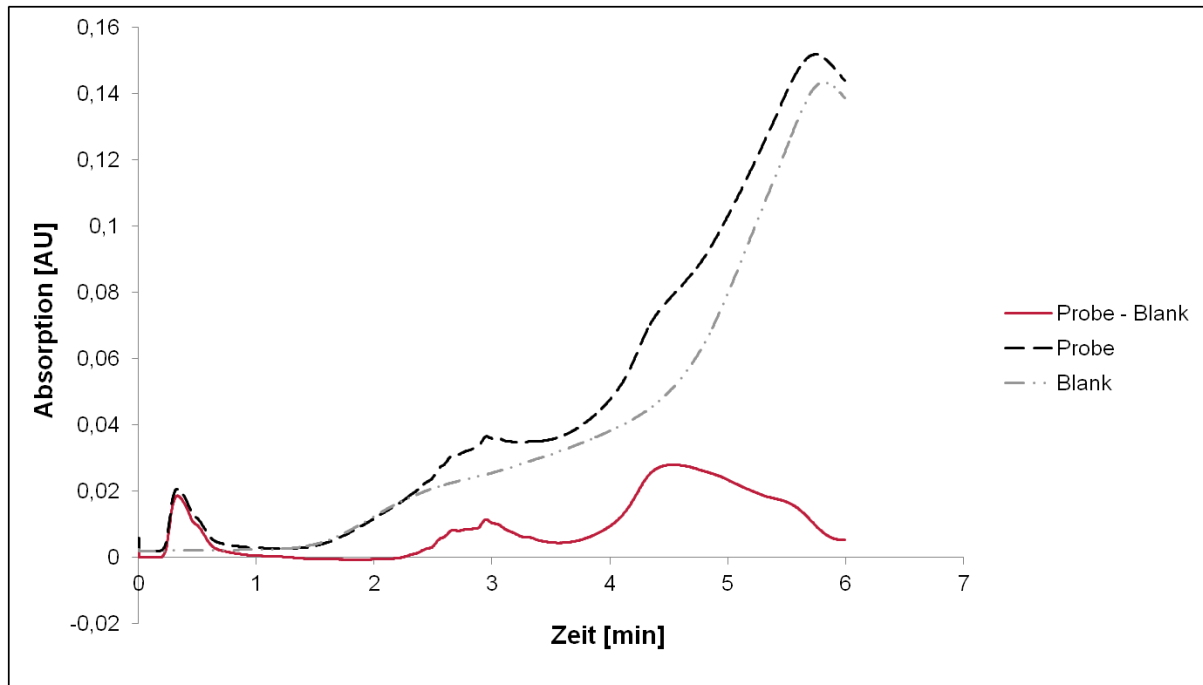


Abb. 3-5 zeigt die nötige Rechenoperation zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der entwickelten SAX-Methode zur Trennung von Myoglobin, Ovalbumin und BSA (Konzentration je 25 µg /ml) bei der die UV-Rohdaten der Blankinjektion (hellgrau-gestrichelte Linie) von den UV-Rohdaten der Probe (schwarz-gestrichelte Linie) abgezogen werden müssen, sodass ein neues Chromatogramm (rote kontinuierliche Linie) entsteht, bei dem nun wieder deutliche Ovalbumin- und BSA-Peaks erkennbar sind; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2

#### 3.1.4 Methodenentwicklung Antikörper

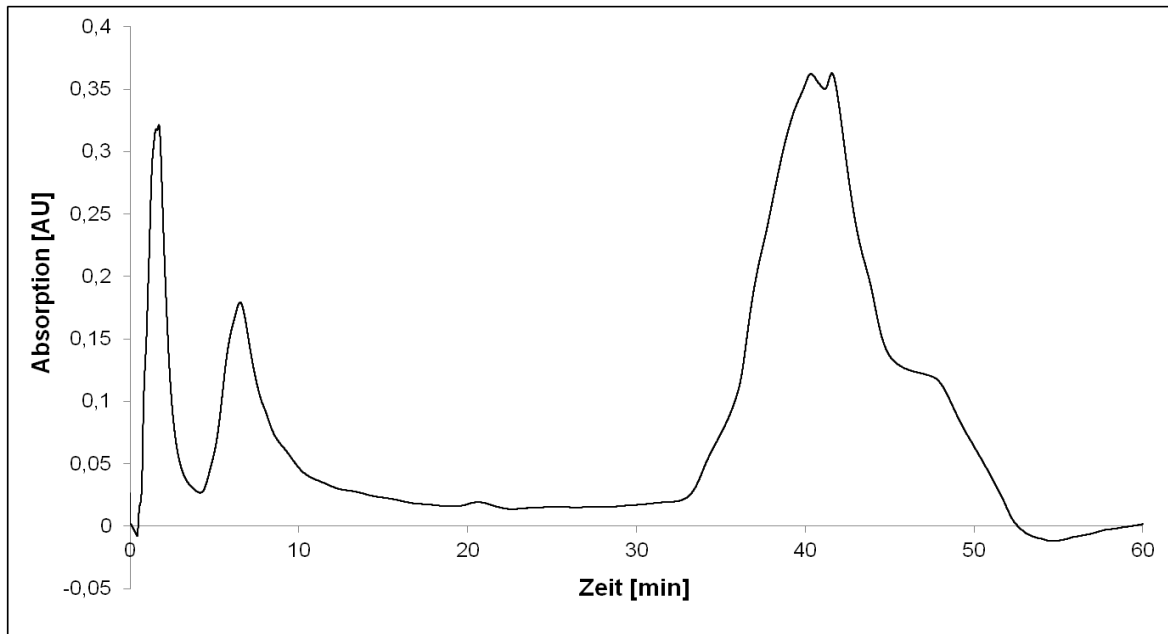
Nachdem erfolgreich eine Methode zur Trennung von Modellproteinen mit der SAX-Säule entwickelt werden konnte, sollte auch eine Methode zur Analyse eines monoklonalen Antikörpers als praxisorientierteres Beispiel entwickelt werden. Hierfür wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, um ähnliche Trennungen mit einem starken Anionenaustauscher als Ausgangspunkt verwenden zu können. Es fanden sich nicht viele Methoden für analytische Trennungen mit der SAX, da diese primär zur Proteinaufreinigung, beispielsweise in der Biotechnologie bei der Herstellung von Immunglobulinen, verwendet wird [190,191,194]. Einen Grund dafür liefert Teshima - auf Grund ihrer Struktur wird zur Analyse von monoklonalen Antikörpern eher die Kationenaustauschchromatographie bevorzugt [195]. Trotz allem fanden sich in dieser Publikation mögliche Trennparameter für die Antikörperanalyse mit der SAX. Hiervon ausgehend und mit der Kenntnis, dass in der Kationenaustauschchromatographie zumeist pH-Werte um 6,0 für die Antikörperanalyse verwendet werden (vgl. Abschnitt 3.3.5), wurden für die Methodenentwicklung Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten im Abstand von 0,5 pH-Einheiten eingesetzt [196]. Dieser Ansatz war nötig, da der isoelektrische Punkt des vorliegenden Antikörpers nicht bekannt war. In Tab 3-2 sind die während der Methodenentwicklung erprobten Parameter aufgeführt.



Tab. 3-2 Übersicht über getestete Parameter während der Methodenentwicklung der SAX-Trennung des monoklonalen Antikörpers; die hervorgehobenen Parameter waren die Vielversprechendsten

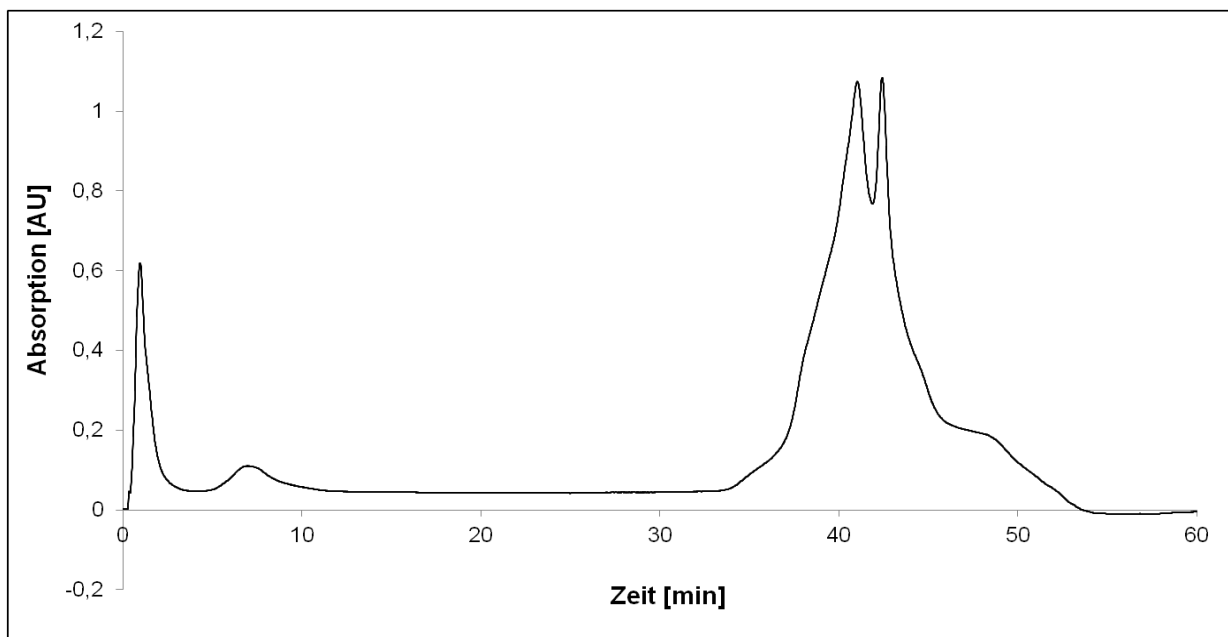
	<b>Methode</b>
<b>Eluent A</b>	<b>10 mM Tris-HCl Puffer</b> 10 mM Phosphatpuffer
<b>Eluent B</b>	Eluent A + 1 M NaCl
<b>pH-Wert</b>	8,0; <b>7,5; 7,0</b> ; 6,5; 6,0
<b>Gradient</b>	2 - 50 % B in 30 min; 0 - 30 % B in 30 min; 0 - 10 % B in 30 min; <b>0 - 5 % B in 30 min</b>
<b>Flussrate</b>	<b>1 ml/min</b> ; 0,5 ml/min
<b>Injektionsvolumen</b>	10 µl; <b>20 µl</b> ; 40 µl; 60 µl

Erste Läufe wurden mit dem zuvor für die Proteintrennung erfolgreich eingesetzten Gradienten von 2 bis 50 % Eluent B in 30 Minuten unter Verwendung von Tris-HCl-Puffer pH 8,0 (Tris-HCl=Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid) durchgeführt. Obwohl im Laufe der SAX-Methodenentwicklung für die Modellproteine bessere Erfahrungen mit einer Ionenstärke von 20 mM gemacht wurden, wurde für den Antikörper analog zu den Dionexstandardapplikationen [197] hier ein Puffersystem mit 10 mM verwendet. Bei Einsatz des oben genannten Gradienten erfolgte eine sehr schnelle Elution zweier Peaks, weshalb im Folgenden der Bereich des Gradienten bei dem die Elution erfolgte (0-5 % B) auf einen längeren Zeitraum ausgedehnt wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 3-6 dargestellt. Das erhaltene Chromatogramm zeigt zwei weitestgehend getrennte aber doch sehr breite Peaks, die bis Minute 10 auftauchen. Der bei etwa 40 Minuten auftauchende „Peak“ ist gradientenbedingt (vgl. Abschnitt 3.1.3). An dieser Stelle des Chromatogrammes findet nach der stetigen Steigerung der Ionenstärke bis 100 % Eluent B um fest adsorbierte Proteine zu lösen, die Reequilibrierung zu Startkonditionen statt. Da allerdings in der Spitze dieses Peaks zwei Maxima auftauchen, kann man an dieser Stelle vermuten, dass auch hier noch etwas aus der Probe eluiert wird, was zuvor stark an der Säule gehaftet hat. Auf Grund der sehr breiten Peaks und der nicht vollständigen Trennung wurde die Methode noch weiter optimiert, indem andere pH-Werte verwendet wurden.



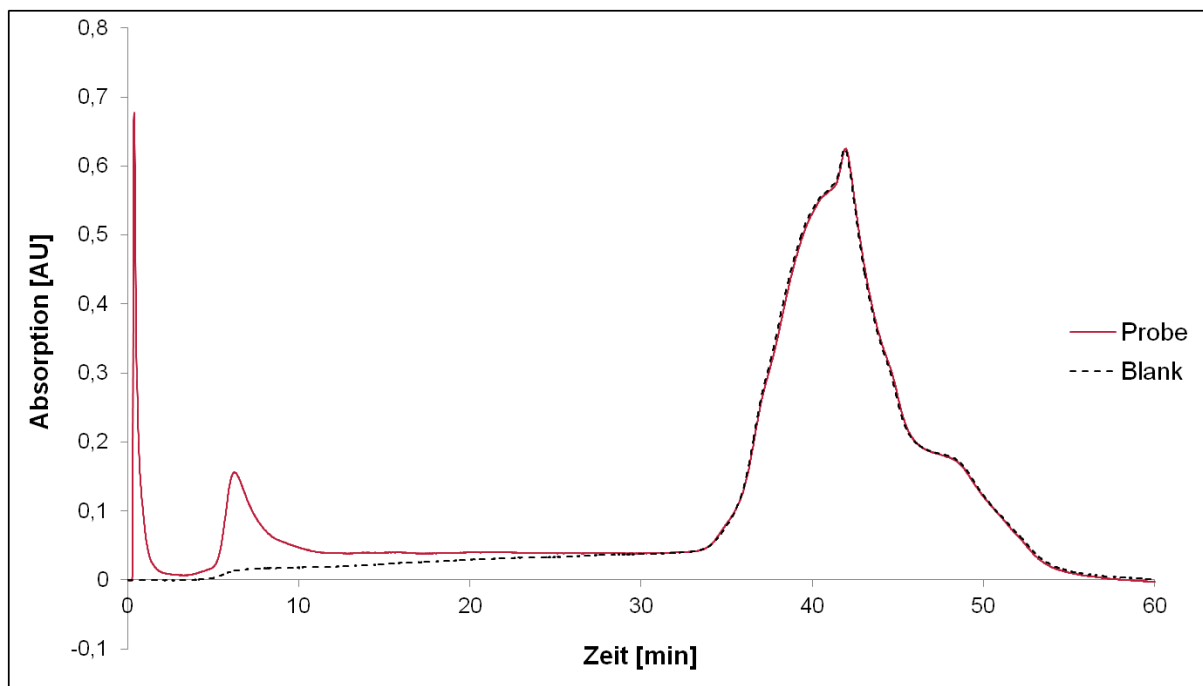
**Abb. 3-6** Repräsentatives Chromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit SAX in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 mit einem Gradienten von 0 bis 5 % B in 30 min bei einer Flussrate von 1 ml/min und einem Injektionsvolumen von 40 µl; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3

Die im Folgenden dargestellten Chromatogramme Abb. 3-7 und 3-8 zeigen die Trennung des Antikörpers mit demselben Gradienten wie zuvor verwendet, aber bei unterschiedlichen pH-Werten des Tris-HCl-Puffers. Das Chromatogramm in Abb. 3-7 (Tris-HCl-Puffer pH 7,5) zeigt ganz deutlich, dass auch hier durch den eigentlichen Gradienten, der 30 min dauert, nicht alles von der Probe eluiert werden konnte. Bei höherer Ionenstärke erfolgt die Elution der auf der Säule verbliebenen Proteinbestandteile in dem Gradientenpeak der bei 40 min erscheint. Deshalb ist diese Methode für die angestrebte Quantifizierung nicht einsetzbar.



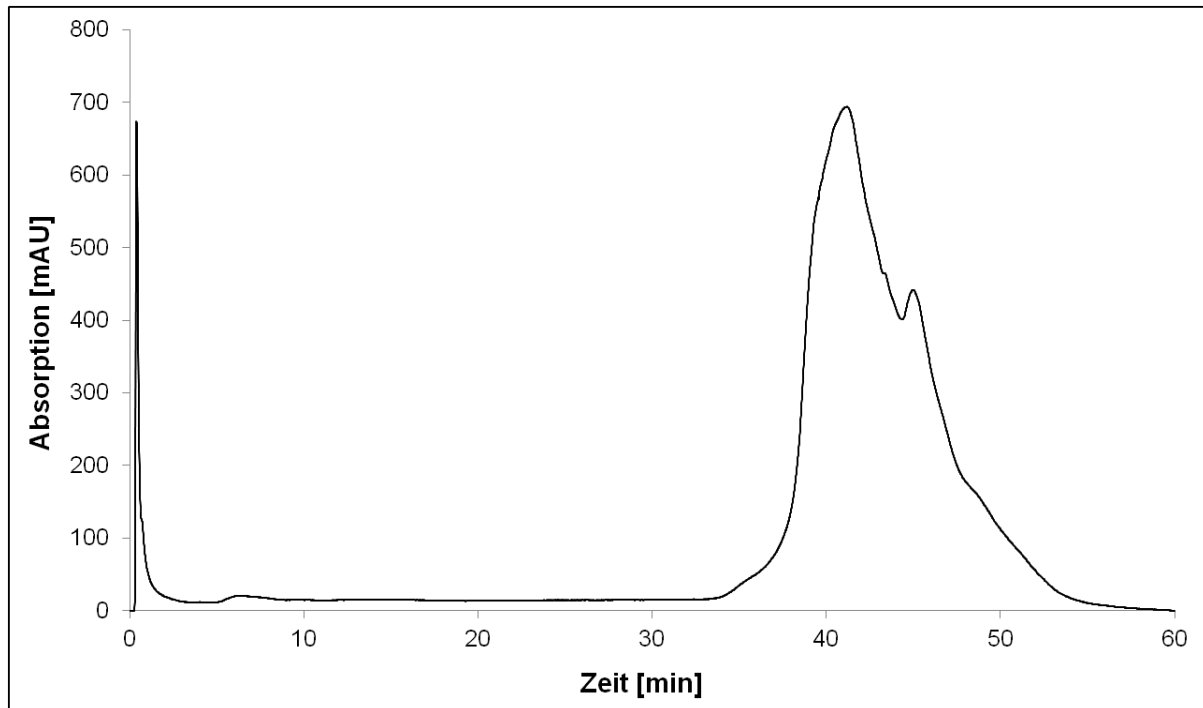
**Abb. 3-7** Repräsentatives Chromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit SAX in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 mit einem Gradienten von 0 bis 5 % B in 30 min; zur Entfernung stärker haftender Probenbestandteile wurde nach dreißig Minuten die Ionenstärke erhöht indem der Gradient bis 100 % B gefahren wurde mit anschließender Reequilibration zu Startkonditionen; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3

Bei Verwendung eines Tris-HCl-Puffersystems pH 7,0 wurde eine akzeptable Trennung erreicht (Abb. 3-8). Hervorzuheben ist hierbei der schmale erste Peak, sowie eine deutliche Basislinientrennung ( $R_s=2,81$ ). Wie schon bei den zuvor präsentierten Chromatogrammen ist bei etwa 40 min erneut ein „Peak“ erkennbar. Dieser verbirgt im Gegensatz zu den vorigen Chromatogrammen allerdings keine Bestandteile des Antikörpers mehr. Dieses kann durch Betrachtung eines Blanklaufes (Abb. 3-8, schwarze gestrichelte Kurve) geklärt werden, da hierbei derselbe Peak entsteht. Folglich kann in diesem Fall von einer vollständigen Elution des Antikörpers und einer Eignung für eine anschließende Quantifizierung ausgegangen werden. Für die Puffersubstanz Tris wird je nach Quelle ein  $pK_s$ -Wert von 8,07 [198] oder 8,3 [199] oder vom Hersteller Sigma Aldrich 8,1 [200] angegeben. Die Pufferkapazität liegt dementsprechend in einem pH-Bereich von 7,6 bis 8,6 [198], 7,7 bis 8,9 [199] oder 7,0 bis 9,0 [200]. Da die Pufferkapazität von Tris bei dem hier eingestellten pH-Wert von 7,0 und einer Ionenstärke von 10 mM nicht mehr allzu groß ist, wurde die Trennung noch einmal in Phosphatpuffer durchgeführt (Abb. 3-9).



**Abb. 3-8 Repräsentatives Chromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit SAX in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,0 mit einem Gradienten von 0 bis 5 % B in 30 min (rot) und ein Blank derselben Methode (schwarz gestrichelt); weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3**

Hierbei konnte zwar auch ein schmaler erster Peak erhalten werden, dafür war der zweite zuvor deutliche Peak fast nicht erkennbar. Weiterhin wurde in dem Phosphatpuffersystem nicht der komplette Antikörper durch den Gradienten eluiert, sodass hier wiederum ein Peak ( $t_R=45,01$  min) in dem „Gradientenpeak“ bei 40 min auftauchte.



**Abb. 3-9** Beispielchromatogramm der SAX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 mit einem Gradienten von 0-5 % B in 30 min; wie bei den zuvor beschriebenen Puffersystemen (siehe Abb. 3-7 und 3-8) wurde auch hier der Gradient bis 100 % Eluent B zur Säulenreinigung verwendet und anschließend zu Startkonditionen reequilibriert; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3

Aus diesem Grund wurde die in Abb. 3-8 dargestellte Trennung, beziehungsweise die zugehörige Methode für die abschließenden Vergleiche der Trennmechanismen bezüglich des Antikörpers herangezogen. An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass bisher noch keine Präzisionsmessungen mit dieser Methode durchgeführt wurden und auch noch keine Identifizierung der zwei detektierten Peaks erfolgte.

## 3.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)

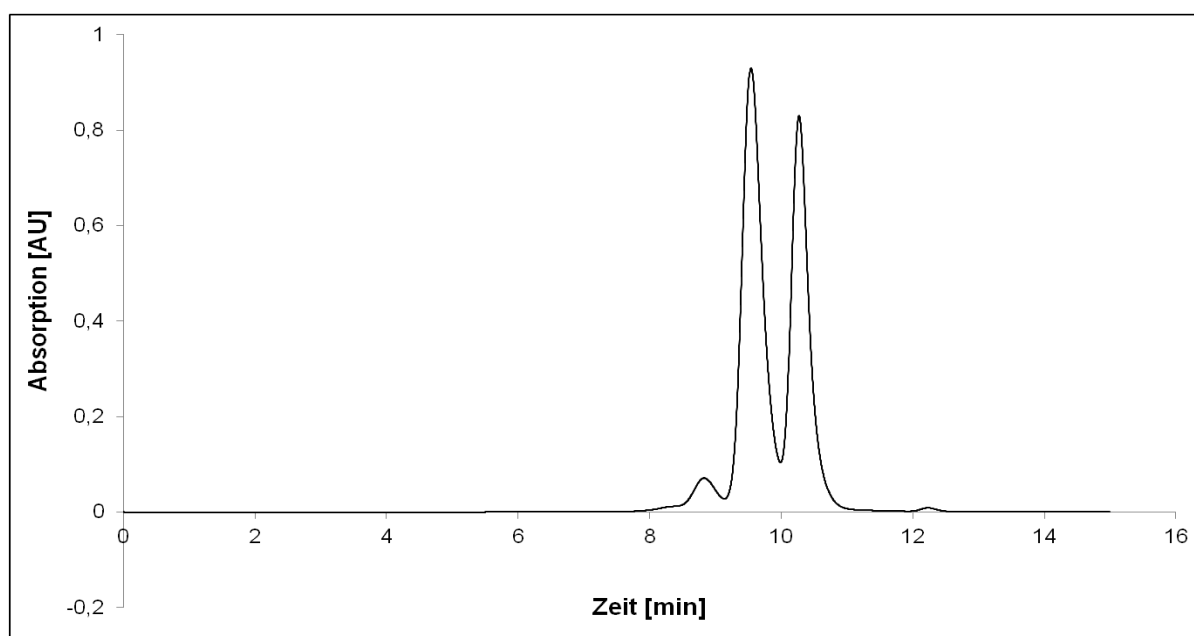
Die Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie (engl.: high performance size exclusion chromatography, HP-SEC) wird üblicherweise zur Größenbestimmung von großen Molekülen wie Polymeren oder auch Proteinen eingesetzt. Auch wenn die Massenspektrometrie große Fortschritte in den letzten Jahren gemacht hat und über eine sehr hohe Selektivität verfügt, ist die deutlich günstigere SEC heute noch die erste Wahl zur Größenbestimmung und Aggregatdetektion von Polymeren und auch Proteinen [19,25,201]. Die Aggregatdetektion und –quantifizierung ist essentiell während der Proteinformulierung, da solche Aggregate einerseits zu einem Wirksamkeitsverlust führen können und andererseits auch allergische Reaktionen nach der Injektion auslösen können [25,202–205]. Dr. Lukas Kaminski hat in seiner Arbeit gezeigt, dass eine Quantifizierung mit der sogenannten nicht-idealen SEC zur Trennung von Myoglobin und Ovalbumin möglich ist [183]. Deshalb wird in diesem Abschnitt zu den Modellproteinen nicht wie im Rest dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf die Quantifizierung gelegt, sondern auf einen Vergleich von zwei SEC-Trennsäulen, mit dem gezeigt werden soll, dass die nicht-idealen Bedingungen auch unter Verwendung anderer Trennsäulen einsetzbar sind. Der Begriff der nicht-idealen SEC wurde 1982 von Kopaciewicz und Regnier geprägt [206]. Im Vergleich zur sonst idealen Größenausschlusschromatographie, wie sie in Abschnitt 2.1.2.2 beschrieben ist und bei der

keinerlei Wechselwirkungen mit der Trennsäule erfolgen, werden in der nicht-idealen SEC die Bedingungen wie pH-Wert und Ionenstärke so verändert, dass sowohl Wechselwirkungen mit der Trennsäule als auch zwischen den Proteinen möglich sind. Diskutiert werden hierbei vor allem elektrostatische Wechselwirkungen [206]. Dieses kann dann zu einer Steigerung der Selektivität führen, sodass hierbei die Möglichkeit besteht Myoglobin und Ovalbumin zu trennen, was mit der idealen SEC nicht möglich war [183]. Da durch den nicht-idealen Modus zusätzliche Trenneffekte zum Tragen kommen, wäre als Bezeichnung auch die „erweiterte“ oder die „modifizierte“ SEC denkbar. Wie bei den anderen vorgestellten Trennmechanismen schließt sich eine Trennung eines monoklonalen Antikörpers an.

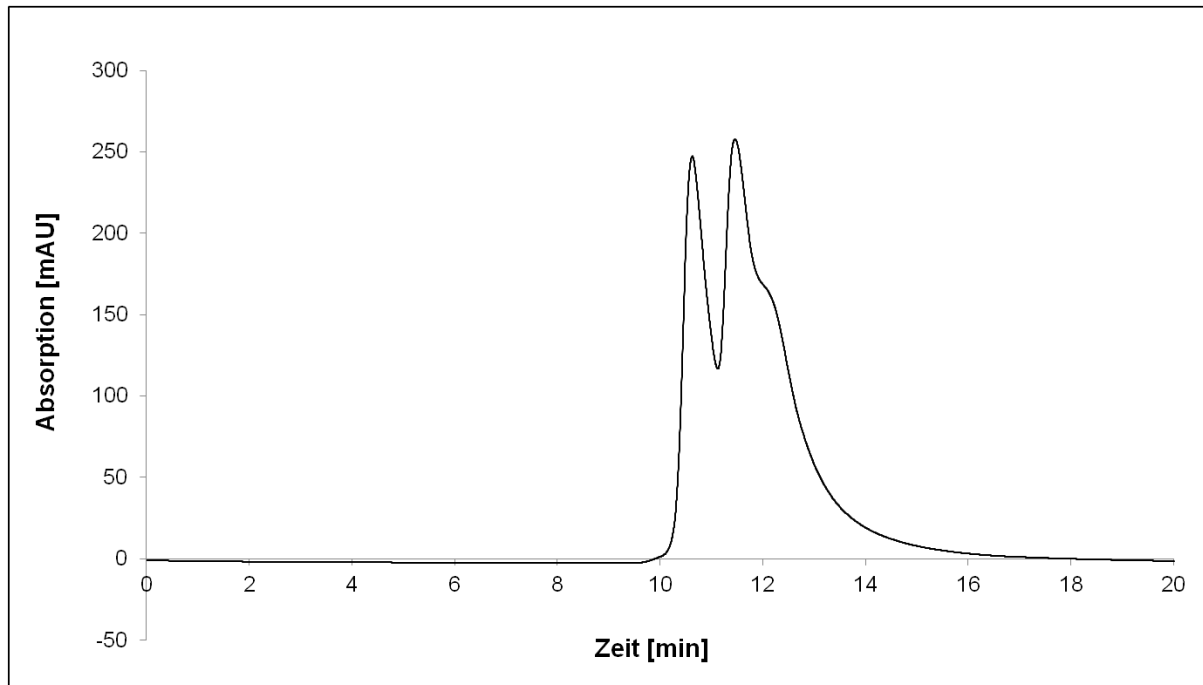
Obwohl normalerweise in der SEC Elutionsvolumina statt Retentionszeiten der Peaks angegeben werden (vgl. Abschnitt 2.1.2.2), werden in diesem Kapitel zur besseren Vergleichbarkeit und Übersichtlichkeit Retentionszeiten der Peaks verwendet. Dieses ist möglich, da immer eine Flussrate von 1 ml/min verwendet wurde und somit das Elutionsvolumen der Retentionszeit gleichgesetzt werden kann.

### 3.2.1 Idealer Modus

Da die Trennung von Myoglobin und Ovalbumin zunächst im idealen Modus von Dr. Lukas Kaminski mit der PSS Proteema Säule durchgeführt wurde, wurde auch mit der Phenomenex-Säule (vgl. Abschnitt 6.1.2.2) eine Trennung in diesem Modus zum Vergleich angestrebt. Die Abbildungen 3-10 und 3-11 zeigen die Trennung von Myoglobin (jeweils Hauptpeak 2) und Ovalbumin (jeweils Hauptpeak 1) unter gleichen Trennbedingungen, allerdings mit unterschiedlichen Trennsäulen. Schon auf den ersten Blick lässt sich erkennen, dass die beiden Proteine mit der Phenomenexsäule (Abb. 3-10) besser getrennt werden konnten als mit der von PSS (Abb. 3-11). Dieses bestätigt sich auch, wenn man das Peak-Tal-Verhältnis betrachtet. Dieses beträgt für das in Abb. 3-10 abgebildete Chromatogramm 7,86 und für das in Abb. 3-11 nur 2,15.



**Abb. 3-10 SEC-Trennung von Ovalbumin ( $t_R=9,52$  min) und Myoglobin ( $t_R=10,27$  min) im idealen Modus unter Verwendung der Säule BioSep™ s-3000 von Phenomenex; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.1**



**Abb. 3-11** zeigt ein repräsentatives SEC-Chromatogramm im Idealen Modus der Trennung von Ovalbumin ( $t_R=10,6$  min) und Myoglobin ( $t_R=11,43$  min) mit der Säule Proteoma 300 Å, 5 µm (300 x 8 mm, PSS) und einer Vorsäule (8 x 50 mm, PSS) aus [183]

Die im idealen Modus erhaltenen Ergebnisse lassen schon auf eine unterschiedliche Selektivität der Säulen schließen und zeigen auch, dass eine Analyse von Myoglobin und Ovalbumin mit der Phenomenex-Säule zwar möglich ist, aber auf Grund der fehlenden Basislinientrennung ist ebenso keine Quantifizierung durchführbar. Die unterschiedliche Selektivität lässt sich über die verschiedenen großen Trenn- bzw. Ausschlussbereiche der Säulen erklären. Für die Phenomenex-Säule wird ein Bereich von 5-700 kDa angegeben [207] und für die Säule von PSS bei gleicher Länge und Durchmesser ein Bereich von 1-1200 kDa [208]. Dementsprechend verfügt die Säule von Phenomenex über eine größere Auflösung, was sich in der höheren Selektivität widerspiegelt.

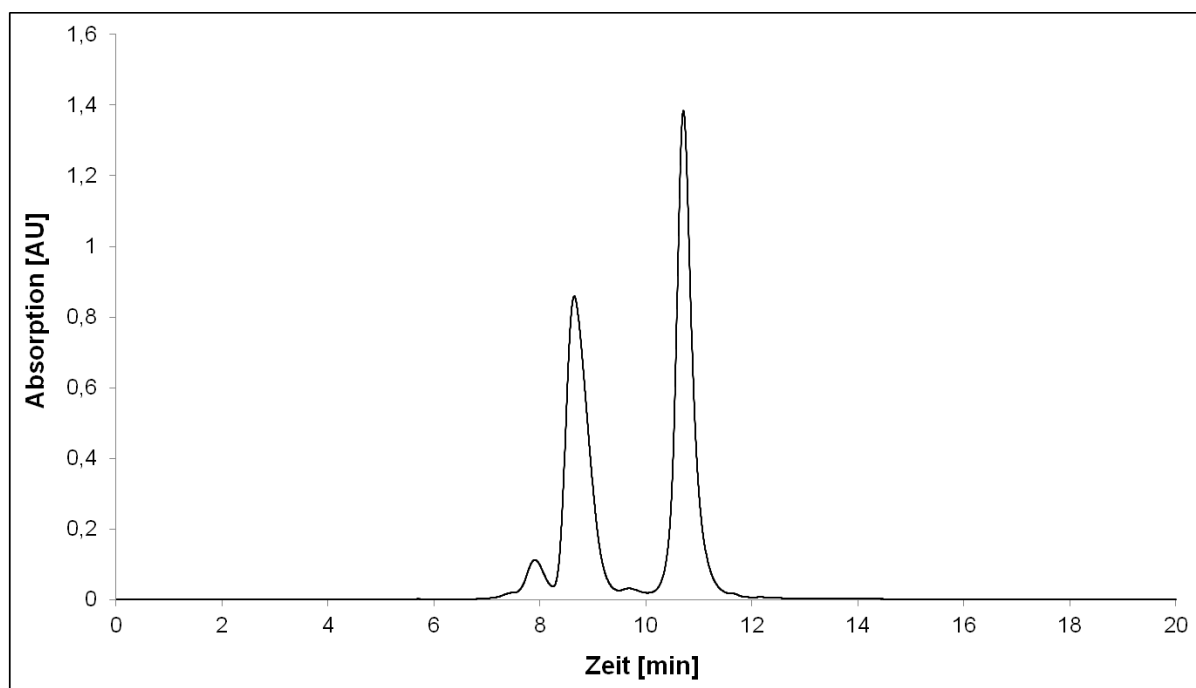
#### 3.2.2 Nicht-Idealer Modus

Nachdem sich schon im idealen Modus deutliche Selektivitätsunterschiede zeigten (vgl. Abschnitt 3.2.1), sollte nun ein Vergleich im nicht-idealen Modus durchgeführt werden. Dieses war eine deutlich größere Herausforderung, da SEC-Säulen von den Herstellern nur unter idealen Bedingungen bzw. im idealen Modus getestet werden, weil sie nach wie vor weitestgehend zur Größenbestimmung eingesetzt werden. Deshalb konnte bei diesen Messungen davon ausgegangen werden, dass hierbei ein vernünftiges Ergebnis erhalten wird. Der nicht-ideale Modus ist hingegen wenig verbreitet und wird deshalb nicht bei den Standardtests der Säulen mit geprüft. Je nach Beschaffenheit der stationären Phase müssen die Bedingungen für diesen Modus individuell ermittelt werden.

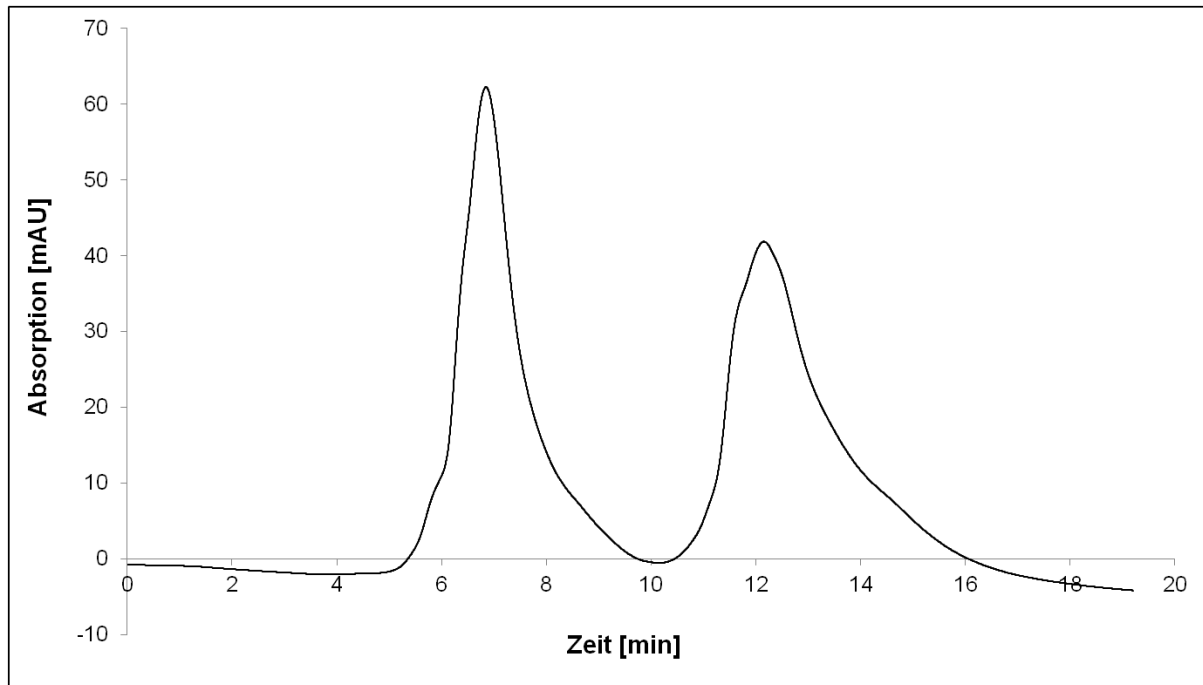
Trotzdem wurden für die Trennung mit der Säule von Phenomenex dieselben Bedingungen wie von Kaminski [183] für die Säule von PSS beschrieben verwendet. Das mit der Phenomenexsäule erhaltene Ergebnis der Trennung von Myoglobin und Ovalbumin ist in Abb. 3-12 dargestellt. Dieselbe Trennung mit der Säule von PSS ist in Abb. 3-13 dargestellt. Wie schon im idealen Modus sind im Vergleich offensichtliche Unterschiede erkennbar. Mit der Säule von Phenomenex wurden sehr viel schmalere Peaks erhalten und es konnten

noch weitere NebenkompONENTEN ( $t_R=7,90$  min und  $t_R=9,68$  min) abgetrennt werden, was von einer höheren Trennleistung zeugt. Dieses bestätigt sich auch durch die Berechnung der Anzahl der theoretischen Böden, wobei die berechnete Plattenzahl für den Myoglobinpeak (jeweils Hauptpeak 2) bei  $N=6603$  für die Säule von Phenomenex (Abb. 3-12) und bei  $N=243$  für die Säule von PSS (Abb. 3-13) liegt.

Was auf den ersten Blick vorteilhaft wirkte, stellte sich allerdings als negativ für die angestrebte Quantifizierung heraus. Der Peak mit einer Retentionszeit von 9,68 min in Abb. 3-12 ist der sogenannte Vorpeak des Myoglobins, wie auch Ovalbumin über einen verfügt. Dieser kompliziert allerdings die exakte Quantifizierung der einzelnen Proteine, da nicht sicher ist, wie viel dieses Vorpeaks in dem Ovalbuminpeak verschwindet (vgl. ausführliche Diskussion in [183]). Diese Problematik zeigte sich bei der Trennung mit der PSS Säule nicht, da hier alle NebenkompONENTEN durch die nicht-idealen Bedingungen unterdrückt wurden, sodass nur zwei Hauptpeaks resultierten. Demzufolge war hier eine exakte Quantifizierung besser möglich, obwohl die Selektivität der Phenomenexsäule deutlich höher ist. Die Problematik der exakten Quantifizierbarkeit spiegelt sich auch in den Präzisionswerten im Vergleich beider Säulen wieder (vgl. Abschnitt 3.2.2.1). Deshalb sollten nicht-ideale Trennbedingungen, auch wenn sie für ein und dasselbe Trennproblem entwickelt wurden auch der Trennsäule angepasst werden, um optimale Ergebnisse zu erhalten. In diesem Fall wäre beispielsweise durch eine Optimierung der Bedingungen gegebenenfalls noch eine bessere Auflösung zwischen dem Vorpeak des Myoglobins und dem Ovalbuminpeak erreichbar, sodass die Quantifizierbarkeit verbessert würde.



**Abb. 3-12** Repräsentatives Chromatogramm der SEC-Trennung von Ovalbumin ( $t_R=8,64$  min) und Myoglobin ( $t_R=10,73$  min) im nicht-idealen Modus mit der Säule BioSep™ s-3000 von Phenomenex; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.2



**Abb. 3-13 SEC-Trennung im nicht-idealen Modus von Ovalbumin ( $t_R=6,80$  min) und Myoglobin ( $t_R=12,08$  min) mit der Säule Proteema 300 Å, 5 µm (300 x 8 mm, PSS) und einer Vorsäule (8 x 50 mm, PSS) aus [183]**

Abschließend lässt sich sagen, dass eine Übertragung von nicht-idealen Bedingungen von einer Trennsäule zu einer anderen prinzipiell möglich ist. Allerdings ist, wie an Hand dieses Beispiels gezeigt werden konnte, anschließend noch eine weitere Anpassung der Bedingungen an die Säule notwendig, da die nicht-idealen Bedingungen nicht nur durch die Analyten, sondern auch durch die Säule bedingt sind. Dieses ist sinnig, da durch den veränderten pH-Wert und die modifizierte Ionenstärke nicht nur Wechselwirkungen zwischen den Proteinen, sondern auch mit der stationären Phase ermöglicht werden, wie schon von Kopaciewicz und Regnier beschrieben [206].

### 3.2.2.1 Präzision der SEC-Trennung von Myoglobin und Ovalbumin

Mit beiden Größenausschlusssäulen konnten gute Präzisionswerte für die Tag-zu-Tag Standardabweichung der Retentionszeiten erreicht werden. Für die Phenomenexsäule lag die Präzision der Retentionszeit für beide Proteine < 1 % relative Standardabweichung. Bei Trennung mit der PSS Säule wurden von Kaminski noch geringere RSD % erreicht [183]. Die Präzisionsdaten der Peakflächen derselben Trennung beider SEC-Säulen sind in den Tab. 3-3 für die Säule von Phenomenex und Tab. 3-4 für die Säule von PSS aufgeführt. Im Vergleich fällt auf, dass für die Wiederholpräzision beider Säulen sehr gute Werte in einem ähnlichen Bereich zwischen 1,0 und 1,5 % relativer Standardabweichung erreicht werden konnten. Die mit der Säule von PSS erreichte Tag-zu-Tag Präzision der Peakflächen liegt mit relativen Standardabweichungen von unter zwei Prozent in dem zur Qualitätskontrolle geforderten Rahmen, sodass auch hier, wie schon von Kaminski [183] beschrieben, eine Eignung der SEC für die Quantifizierung vorliegt. Die Tag-zu-Tag Präzision, welche mit der Phenomenexsäule erreicht wurde, liegt mit über fünf Prozent relativer Standardabweichung deutlich höher. Hier wurden also deutlich größere Schwankungen zwischen den Tagen beobachtet. Zur Verdeutlichung befindet sich eine Kontrollkarte der Tag-zu-Tag Präzision der Phenomenex-Säule im Anhang (Abschnitt 7, Abb. 7-1), woraus die Schwankungen der Peakflächen zwischen den Tagen erkennbar sind.



Tab. 3-3 Ergebnisse der Präzisionsmessungen der Peakflächen der SEC-Trennung von Myoglobin und Ovalbumin mit der Säule BioSep™ s-3000 von Phenomenex

	Wiederholpräzision Fläche <sub>pooled</sub> (RSD% n=20)	Tag-zu-Tag Präzision Peakfläche (RSD% n=60)
Ovalbumin	1,24	5,18
Myoglobin	1,01	7,73

Tab. 3-4 Präzisionsdaten der Peakflächen der Trennung von Myoglobin und Ovalbumin mit der Säule Proteema 300 Å, 5 µm von PSS aus [183]

	Wiederholpräzision Fläche <sub>pooled</sub> (RSD% n=20)	Tag-zu-Tag Präzision Peakfläche (RSD% n=60)
Ovalbumin	1,05	1,07
Myoglobin	1,49	1,82

Ein eindeutiger Grund konnte für diesen Sachverhalt bisher nicht identifiziert werden. Mögliche Erklärungsansätze belaufen sich auf Ungenauigkeiten bei der Probenvorbereitung oder der Herstellung der mobilen Phase. Eine andere Möglichkeit sind tatsächliche Schwankungen der Temperatur zwischen den Tagen, wobei dieses kaum eine so große Auswirkung hätte, wie hier beobachtet. Auch die schon angesprochene Problematik der Quantifizierung auf Grund des zusätzlich aufgetauchten Vorpeaks des Myoglobins ist denkbar.

### 3.2.3 Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen zur Proteinprobe

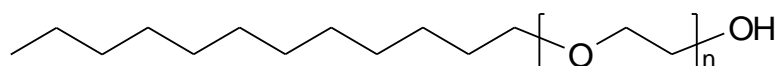
Da Proteine schon von Natur aus dazu neigen Aggregate zu bilden (vgl. Abschnitt 3.2), sollte dieses durch möglichst schonende Bedingungen bei der Probenvorbereitung und Proteinformulierung während der Herstellung vermieden werden. Es werden viele Punkte diskutiert, die zu vermehrter Aggregatbildung führen können, wie beispielsweise das Schütteln während der Proteinformulierung als Stressfaktor [203]. Des Weiteren werden Frieren und Tauen der Proteinproben als Faktoren für die Aggregatbildung diskutiert und auch höhere Temperaturen während der Probenvorbereitung können die Bildung dieser begünstigen [25]. Außerdem wird die Anwendung von Ultraschall als Faktor für Strukturveränderungen der Proteine genannt [209].

Wie in Abschnitt 6.3.1 beschrieben, kam während der Probenvorbereitung der Proteine in allen getesteten Trennmechanismen ein Ultraschallbad zum Einsatz um die Proteine besser und schneller in Lösung zu bringen. Da dabei sowohl der Ultraschall als auch eine höhere Temperatur (durch das Ultraschallbad) auf die Proteinproben einwirken und hierdurch ggf. Veränderungen der Proteinstruktur oder Aggregationen induziert werden könnten, wurde eine Alternative gesucht um diesen Schritt zu umgehen. Den Einfluss dieser Faktoren auf die Proteinproben wurde von Tobias Rakow untersucht [210]. Eine Möglichkeit das Ultraschallbad zu umgehen, war die Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen bzw. Emulgatoren, welche zur Lösungsvermittlung eingesetzt werden [211]. Schon 1985 wurde von Heukeskovon und Dernick beschrieben, dass eine Tensidzugabe in der SEC nützlich sein kann [212]. Bei diesem Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob durch diese

Tensidzugabe Unterschiede in den Chromatogrammen feststellbar sind oder eine Tensidzugabe den Einsatz des Ultraschallbades überflüssig macht. Dass Natriumlaurylsulfat (SDS) als anionisches Tensid zur Denaturierung von Proteinen führt, ist hinreichend bekannt. Diese Eigenschaft wird bei der Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) schon seit Jahren genutzt, sodass eine Trennung der Proteine nur noch auf Grund ihres Molekulargewichtes erfolgt, da die Ladungen durch SDS maskiert werden [213]. Allerdings werden auf diese Weise bei der SEC-Analyse andere Chromatogramme auf Grund der veränderten Proteineigenschaften erhalten (vgl. Abschnitt 3.2.3.2). Für das nichtionische Tensid Brij 35 werden hingegen proteinstabilisierende Eigenschaften ohne Proteindenaturierung beschrieben, da dessen Affinität Lipid-Lipid-Bindungen und Lipid-Protein-Bindungen zu spalten größer ist, als Protein-Protein-Bindungen [214]. Aus diesem Grund war bei dessen Zugabe mit geringen Veränderungen der Chromatogramme zu rechnen (vgl. Abschnitt 3.2.3.1). Um einen Vergleich zwischen einem denaturierendem Tensid und einem Nichtdenaturierendem zu haben, wurden sowohl Versuche mit SDS als auch Versuche mit Brij 35 jeweils mit der SEC-Säule von Phenomenex durchgeführt. Bei vielen der publizierten Methoden wurde das Tensid nicht der Probe zugesetzt, wie bei den im Folgenden vorgestellten, sondern der mobilen Phase, sodass von Micellarer- oder Pseudophasen-HPLC gesprochen wurde, wenn die kritische Micellbildungskonzentration überschritten wurde [215,216]. Viele Quellen beschreiben den Einsatz von Tensiden in der RP-Chromatographie [215–217]. Diese Eignung wurde parallel zu den hier aufgeführten SEC-Trennungen von Stefanie Wroblewitz im Rahmen ihrer Diplomarbeit überprüft [218].

#### 3.2.3.1 Brij 35

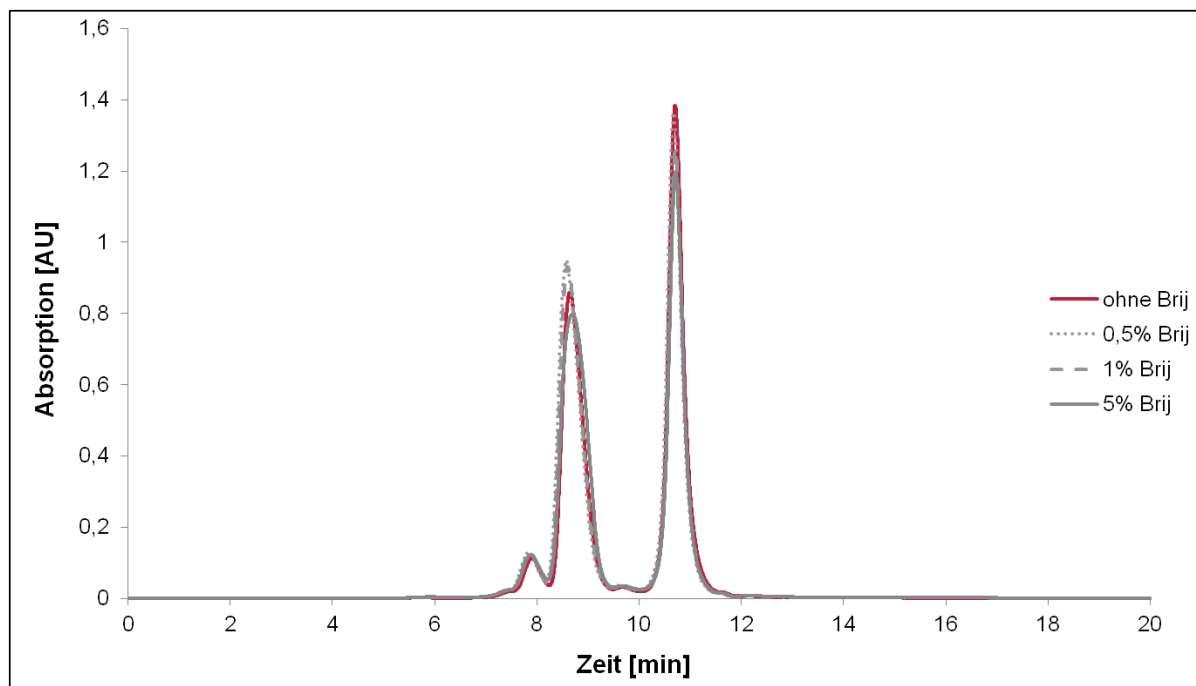
Brij 35 ist der Handelsname von Polyoxyethylen(23)laurylether. Es handelt sich dabei um ein nichtionisches Tensid mit der in Abb. 3-14 dargestellten Struktur.



**Abb. 3-14 Struktur von Brij 35 mit n=23; erstellt mit MDL ISIS Draw**

Da Brij 35 zu keiner Proteindenaturierung führen soll, wurden die Modellproteine Myoglobin, Ovalbumin und BSA zunächst einzeln und anschließend gemeinsam sowohl im idealen als auch im nicht-idealen Modus mit unterschiedlichen Brij-Konzentrationen untersucht, um Unterschiede festzustellen, wenn Brij 35 statt des Ultraschallbades zur Lösung der Modellproteine verwendet wird. Hierbei zeigte sich, dass für Ovalbumin und BSA schon Brij-Konzentrationen von  $\geq 0,005$  % zur quantitativen Lösung ausreichten. Für Myoglobin waren Konzentrationen von  $\geq 1$  % Brij oder, bei niedrigeren Konzentrationen, eine längere Wartezeit nötig. Ein repräsentatives Chromatogramm der nicht-idealen SEC-Trennung von Myoglobin und Ovalbumin ohne und mit verschiedenen Brij-Konzentrationen ist in Abb. 3-15 dargestellt. Hieraus geht hervor, dass bei den eingesetzten Brij-Konzentrationen kaum Veränderungen im Chromatogramm erkennbar sind. Die Retentionszeiten verändern sich kaum merklich, die Auflösung wird nicht beeinflusst und auch auf die Peakflächen hat der Brij-Zusatz nur einen geringen Einfluss im nicht-idealen Modus. Weiterhin wird die Präzision der Methode durch den Brij-Zusatz nicht gemindert (RSD %  $t_R$  ohne Brij=0,16 % (n=30); RSD %  $t_R$  mit Brij=0,33 % (n=30); RSD % Peakfläche ohne Brij=1,09 % (n=30); RSD % Peakfläche mit Brij=0,73 % (n=30)). Für die aufgeführten Präzisionswerte wurde der

Myoglobinpeak (Peak 2) verwendet. Für die Daten mit Brij wurden die Ergebnisse aller eingesetzten Konzentrationen verwendet.



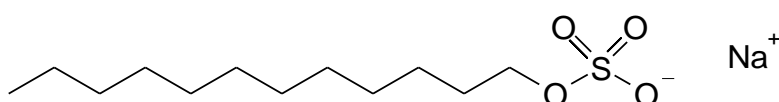
**Abb. 3-15 SEC-Trennung von Myoglobin (Peak 2) und Ovalbumin (Peak 1) im nicht-idealen Modus mit und ohne Brij-Zusatz**

Allerdings muss an dieser Stelle ergänzt werden, dass im idealen Modus schon bei einem 5 %-igem Brij-Zusatz Veränderungen im Chromatogramm erkennbar waren. So nahm der Vorpeak des Ovalbumins ( $t_R=7,83$  min) ab dieser Konzentration deutlich zu (vgl. Abb. 7-2 im Anhang).

Abschließend lässt sich sagen, dass Brij 35 eine nützliche Alternative zum sonst eingesetzten Ultraschallbad im nicht-idealen SEC Modus darstellt, da bei den durchgeführten Messungen nur geringfügige Unterschiede festgestellt wurden. Hierbei wurden allerdings nur Brij-Konzentration bis 5 % getestet. Ob höhere Konzentrationen einen größeren Einfluss haben wurde nicht überprüft.

### 3.2.3.2 Natriumlaurylsulfat

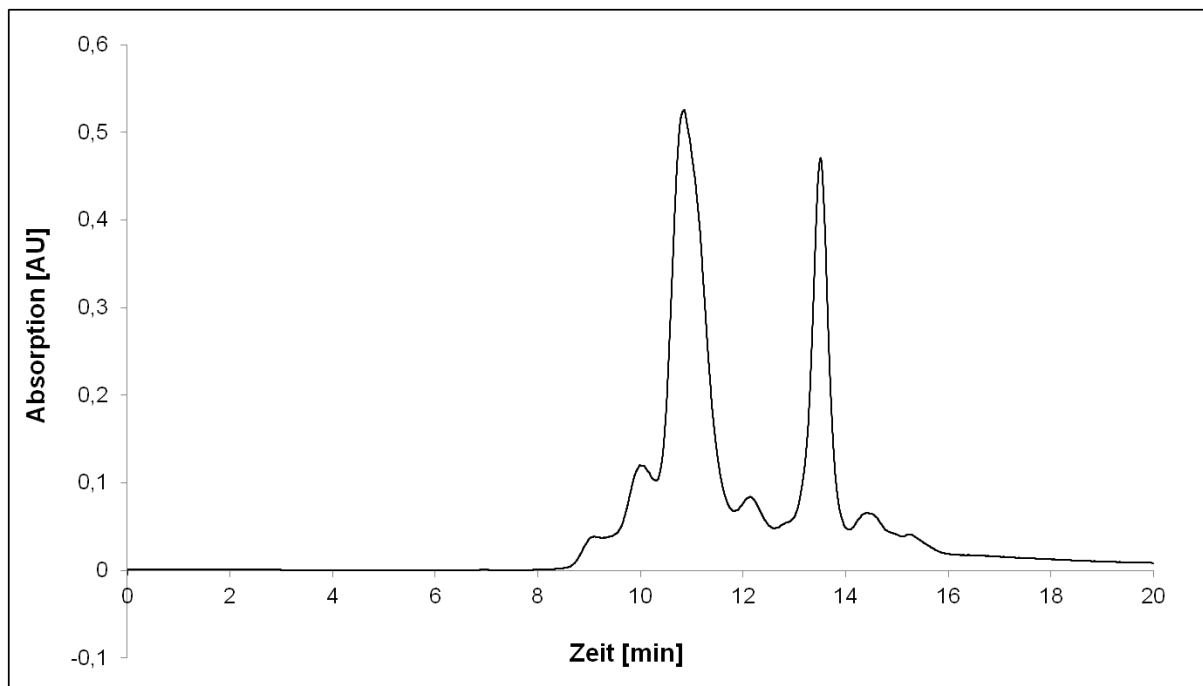
Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate, SDS) ist ein anionisches Tensid mit der in Abb. 3-16 dargestellten Struktur.



**Abb. 3-16 Struktur von SDS; erstellt mit MDL ISIS Draw**

Wie in Abschnitt 3.2.3 erwähnt, führt es zu einer Denaturierung von Proteinen durch die Zerstörung von Tertiär- und Quartärstruktur über die Spaltung nicht-kovalenter Bindungen [219]. Aus diesem Grund wurde SDS ausgewählt anhand der nicht-idealen SEC-Trennung von Myoglobin und Ovalbumin zu zeigen, wie das Chromatogramm der denaturierten Proteine aussieht. Man spricht in diesem Fall von denaturierenden Trennbedingungen. Unter solchen Bedingungen wird für die verwendete Trennsäule ein Trennbereich von 5-100 kDa

angegeben [220]. Hierfür wird aber üblicherweise eine mobile Phase mit 0,5 % SDS-Zusatz verwendet und dieses nicht nur der Probe zugesetzt, wie es bei den hier vorgestellten Versuchen der Fall war. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass bei dem hier erhaltenen Chromatogramm (Abb. 3-17) keine vollständige Denaturierung der Proteine erfolgt ist. Trotzdem sind deutliche Unterschiede zu dem Chromatogramm ohne SDS-Zusatz (Abb. 3-12) und auch dem mit Brij-Zusatz (Abb. 3-15) offensichtlich. In Abb. 3-17 sind deutlich mehr Peaks mit längeren Retentionszeiten erkennbar. Da in diesem Modus mit SDS-versetzten Proben keine Kalibration der Säule erfolgt ist und die Kalibration unter nativen Bedingungen nicht übertragbar ist (vgl. Abschnitt 3.2.5.1), kann keine Aussage über die Größe der detektierten Proteinfragmente gemacht werden. Trotzdem ist die Veränderung deutlich erkennbar und somit das Negativbeispiel geglückt.



**Abb. 3-17 Beispielhafte SEC-Trennung im nicht-idealen Modus von Myoglobin und Ovalbumin mit Zusatz von 0,5 % SDS; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.3**

#### 3.2.4 Vergleichsdaten aus der Industrie

Zur Untermauerung der selbst ermittelten Ergebnisse wurden Beispieldaten von Kooperationspartnern aus der pharmazeutischen Industrie zur Verfügung gestellt. Diese wurden auf ihre Präzision hin untersucht und mit den selbst erreichten Präzisionsdaten der zugehörigen Trennmodi verglichen.

##### 3.2.4.1 Größenausschlusschromatographie

Die Daten zur Größenausschlusschromatographie wurden von zwei unterschiedlichen Firmen (PHAST GmbH und A&M STABTEST GmbH) zur Verfügung gestellt. Die abgebildeten Tabellen mit den Daten beider Firmen zeigen jeweils die Datenstruktur der erhaltenen Messwerte und sind nur als beispielhafte Ausschnitte zu verstehen.

- PHAST GmbH

Tab. 3-5 Datenstruktur der von der PHAST GmbH zur Verfügung gestellten SEC-Daten einer Proteinreinheitsprüfung

Probe	Gesamtfläche
1	105900269
	105693289
2	106003120
	105727174

- A&M STABTEST GmbH

Tab. 3-6 Datenstruktur der von der A&M STABTEST GmbH zur Verfügung gestellten SEC-Daten einer Antikörperanalyse

Probe	Fläche Monomer	Fläche Dimer
1	10329782	35288
	10339650	36192
	10334420	35415
2	10727580	30813
	10760515	31602
	10745737	32405
3	10827715	33411
	10703253	33618
	10747401	32709

Vergleicht man die Anzahl der Messungen der Industriedaten (PHAST GmbH: 2 Messungen und A&M STABTEST: 3 Messungen pro Probe) so fällt auf, dass dies eine deutlich geringere Anzahl von Messungen ist als sie im Rahmen dieser Arbeit für die Wiederholpräzision der einzelnen Trennmechanismen durchgeführt wurde (20 Messungen pro Probe). Die zur Verfügung gestellten Daten entstammen der Routineanalytik beider Firmen und wurden im Gegensatz zu den hier präsentierten Messungen nicht extra für diesen Zweck generiert. Deshalb muss in diesem Zusammenhang bedacht werden, dass in der pharmazeutischen Industrie der Spagat zwischen Wirtschaftlichkeit und Präzision gehalten werden muss, sodass hier ein Kompromiss in der Höhe der Datenzahlen nötig ist.

Tab. 3-7 Präzision der SEC-Industriedaten der Firmen PHAST GmbH und A&M STABTEST GmbH

	RSD % <sub>pooled</sub> Fläche pro Probe	RSD % <sub>pooled</sub> Fläche pro Tag (versch. Proben)	RSD % Fläche zwischen den Tagen
<b>Phast GmbH</b>	0,373 (n=2)	0,452 (n=2x2)	1,86 (n=16)
<b>A&amp;M STABTEST</b>	(n=3/5/6) <sup>a)</sup>	(n=3x3/3x5/3x6) <sup>b)</sup>	(n=51) <sup>c)</sup>
• Monomer	0,331	1,86	2,11
• Dimer	3,85	6,46	24,1

<sup>a)</sup> eine Probe wurde 3-, 5- oder 6-mal vermessen und die daraus resultierenden RSD % der Flächen wurden gepoolt

<sup>b)</sup> drei gleich vorbereitete Proben wurden an einem Tag jeweils 3-, 5- oder 6- mal vermessen und die daraus resultierenden RSD % der Flächen wurden wiederum gepoolt

<sup>c)</sup> die Messungen wurden an vier Tagen aufgenommen, verschiedene Proben und Messungen pro Probe inbegriffen

Ein Vergleich der selbst (bzw. von Dr. Lukas Kaminski) erhobenen Daten der SEC aus Protein- (vgl. Tab. 3-3 und 3-4) und Antikörpertrennungen (vgl. Tab. 3-11) mit den präsentierten Industriedaten kann auf Grund der variierenden Methoden, Proben und Datenzahlen nur recht oberflächlich erfolgen. Trotz allem fällt dabei auf, dass sich die relativen Standardabweichungen in einem sehr ähnlichen Präzisionsbereich befinden. Wobei an dieser Stelle noch einmal die höhere Tag-zu-Tag Standardabweichung der Proteintrennung mit der Phenomenex-Säule zu erwähnen ist, die deutlich über den hier ermittelten Werten liegt. Zusammengefasst kann man von einer relativen Tag-zu-Tag Standardabweichung von etwa 2 % oder besser in der SEC sprechen.

#### 3.2.4.2 Umkehrphasenchromatographie

Die Vergleichsdaten zur Umkehrphasenchromatographie wurden wiederum von der PHAST GmbH zur Verfügung gestellt. Diese wurden mit den von Frau Stefanie Wroblewitz, im Rahmen ihrer Diplomarbeit [218], ermittelten Daten der RP-Chromatographie verglichen (vgl. Abschnitt 3.4.1).

Wie schon in Abschnitt 3.2.4.1 aufgeführt, stellen die Tabellen wieder die Datenstrukturen der erhaltenen Messwerte aus der Industrie dar, welche auf ihre Präzision hin untersucht wurden. Hierbei muss zwischen Diodenarray- und Fluoreszenz-Detektion unterschieden werden.

- Diodenarray-Detektor (DAD)

**Tab. 3-8 Datenstruktur der von der PHAST GmbH zur Verfügung gestellten RP-Daten mit Diodenarray-Detektion**

Probe	Fläche
1	7756503
	7994933
	7948043
2	7963330
	7956366
	7929681
3	8009447
	7981223
	8000763

- Fluoreszenz-Detektor (FLD)

**Tab. 3-9 Datenstruktur der von der PHAST GmbH zur Verfügung gestellten RP-Daten mit Fluoreszenz-Detektion**

Probe	Fläche 1	Fläche 2
1	169652834	105984746
	169639282	105862960
	168935251	105487996
	168634317	105266062
	168141691	104845881
2	169810279	106001395
	169642340	105976901
3	169046804	105835946
	169104123	105815025

Wie schon im vorigen Kapitel beschrieben wurden auch für diesen Trennmechanismus in dem pharmazeutischen Unternehmen nicht so viele Messungen zur Wiederholpräzision durchgeführt. Deshalb wird wiederum das Hauptaugenmerk auf die Tag-zu-Tag Standardabweichung der Peakflächen gelegt, da hier die Datenanzahl der bei den RP-Versuchen von Frau Wroblewitz (vgl. Abschnitt 3.4.1) am Ähnlichsten ist, obwohl natürlich die gleichen Einschränkungen für einen Vergleich wie zuvor schon angesprochen gelten.

**Tab. 3-10 Präzision der RP-Industriedaten der Firma PHAST GmbH mit Diodenarray- und Fluoreszenz-Detektion**

Detektion	RSD % <sub>pooled</sub> Fläche pro Probe/Vial <sup>a)</sup>	RSD % <sub>pooled</sub> Fläche pro Tag (versch. Proben/versch. Vials) <sup>a)</sup>	RSD % Fläche zwischen den Tagen
<b>DAD</b>	1,69 (n=3)	1,47 (n=3x3)	5,76 (n=54)
<b>FLD</b>	(n=2/5) <sup>b)</sup>	(n=1x5/2x2) <sup>c)</sup>	(n=63) <sup>d)</sup>
Peak 1	0,347	1,26	3,81
Peak 2	0,390	1,41	2,65

<sup>a)</sup> bei DA-Detektion wurden mehrere auf gleiche Weise vorbereitete Proben vermessen; bei FL-Detektion wurden verschiedene Vials mit der gleichen Probe vermessen

<sup>b)</sup> eine Probe wurde 2- oder 5-mal vermessen und die resultierenden RSD % der Flächen wurden gepoolt

<sup>c)</sup> eine Probe wurde auf drei Vials verteilt, ein Vial wurde 5-mal vermessen, die anderen je zweimal innerhalb eines Tages und die resultierenden RSD % der Flächen wurden gepoolt

<sup>d)</sup> die Messungen wurden an 7 Tagen durchgeführt, verschiedene Proben und Messungen pro Probe inbegriffen

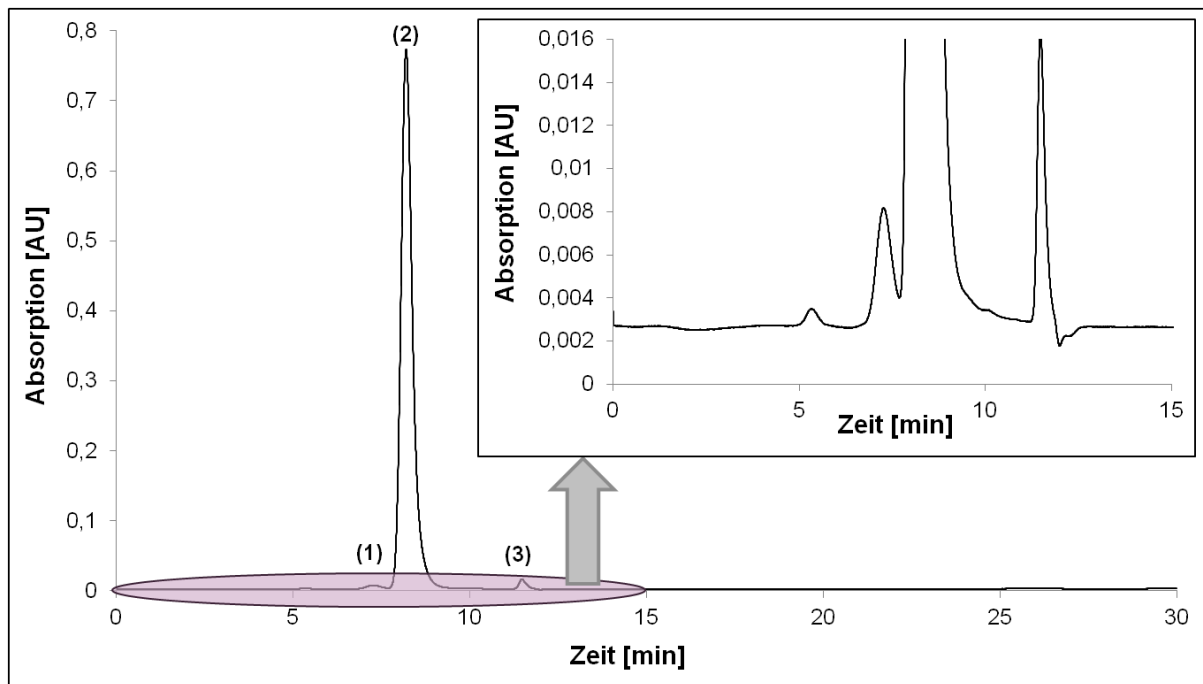
Wie schon zuvor bei der SEC, konnte auch bei diesem Trennmechanismus eine Korrelation zu den von Stefanie Wroblewitz ermittelten Daten (vgl. Tab. 3-18) festgestellt werden, wobei in diesem Falle teilweise auch deutlich bessere RSD % von unter zwei Prozent für die Tag-zu-Tag Standardabweichung erreicht wurden. Da bei den Versuchen von Frau Wroblewitz eine UV-Detektion erfolgte, ist ein direkter Vergleich mit der DA-Detektion sinnvoller als mit der Fluoreszenzdetektion der Industriedaten. An dieser Stelle muss allerdings erwähnt werden, dass bei den Daten der Industrie bei den Messungen der Fläche an einem Tag schon unterschiedliche Proben bei den Präzisionsdaten berücksichtigt wurden und in der nächsten Spalte zusätzlich die Abweichung zwischen den Tagen einbezogen wurden.

Insgesamt konnten die selbst, bzw. durch die Kollegen Dr. Lukas Kaminski und Stefanie Wroblewitz ermittelten Präzisionsdaten durch die Daten aus der pharmazeutischen Industrie bestätigt werden. Weiterhin zeigt die erreichte, größtenteils hohe Präzision, die Eignung für die Qualitätskontrolle der „Protein-HPLC“.

### 3.2.5 Methodenentwicklung monoklonaler Antikörper

Als Grundlage für die Methodenentwicklung der Größenausschlusstrennung eines monoklonalen Antikörpers wurde eine Applikation vom Säulenhersteller Phenomenex verwendet [221]. Hiervon ausgehend wurde die Detektionswellenlänge optimiert, da sich in vorigen Arbeiten und den bisherigen Methoden 214 nm als beste Detektionswellenlänge zeigte (vgl. Abschnitt 3.1.3 und [183]). Des Weiteren wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen vermessen und unterschiedliche Injektionsvolumina getestet, bis schließlich 10 µl bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml mAb als idealer Wert identifiziert wurde. Die von Phenomenex publizierte mobile Phase wurde beibehalten, da sich schon in den ersten Läufen eine sehr gute Trennleistung abzeichnete. So konnten, wie in Abb. 3-18 dargestellt, Dimer (Peak 1), Monomer (Peak 2) und ein Fragment (Peak 3) getrennt werden.

Aus der Vergrößerung geht hervor, dass sogar noch ein größerer Bestandteil ( $t_R=5,30$  min), vermutlich ein größeres Aggregat (Multimer), eluiert wurde.



**Abb. 3-18** Beispielchromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie von (2)=Monomer, (1)=Dimer und (3)=Fragment; mit Vergrößerung des Bereiches von 0 bis 15 Minuten: Peak eines Multimers bei 5,30 min erkennbar; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.4

Monoklonale Antikörper sind sehr potente Arzneimittel, die häufig zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder in der Krebstherapie eingesetzt werden [19–21]. Da diese Biologicals wie alle anderen Proteine zur Aggregatbildung neigen und während einer Therapie direkt injiziert werden, ist es essentiell, mögliche Aggregate detektieren und auch quantifizieren zu können, um allergische Reaktionen nach der Injektion des Arzneimittels zu vermeiden [24]. Mit dem Ergebnis der in Abb. 3-18 präsentierten Methode ist es nicht nur möglich, das Monomer von Nebenkomponenten und Aggregaten zu trennen, sondern dieses auch mit hoher Präzision durchzuführen (vgl. Abschnitt 3.2.5.2).

#### 3.2.5.1 Größenbestimmung des monoklonalen Antikörpers

Zur Größenbestimmung und auch Identifizierung der detektierten Peaks wurde eine Kalibration der Trennsäule durchgeführt. Hierfür wurden mit derselben Methode und demselben Fließmittel wie für die Analyse des monoklonalen Antikörpers BSA ( $M=66$  kDa) und Ovalbumin ( $M=45$  kDa) als Modellproteine für die Größe und Natriumazid ( $M \leq 5$  kDa) als Marker für das Totvolumen der Säule verwendet. Trägt man deren Elutionsvolumen, bzw. deren Retentionszeit gegen die logarithmierten Molmassen in Kilodalton auf [72], so erhält man die in Abb. 3-19 dargestellte Kalibriergerade. Aus dieser können dann, wie in violett beispielhaft für das Fragment gezeigt, über die gemessenen Retentionszeiten (auf der x-Achse) die entsprechenden molaren Massen der einzelnen Peaks (auf der y-Achse) ermittelt werden. Auf diese Weise wurde für Peak (1) eine Masse von 260 kDa und für Peak (2) (jeweils aus Abb. 3-19) eine Masse von 130 kDa ermittelt, was darauf schließen ließ, dass es sich hierbei um Monomer (Peak (2)) und Dimer (Peak (1)) des vermessenen Antikörpers handelt. Vergleicht man die erhaltenen Werte mit Literaturwerten, dann fällt auf, dass diese je nach Quelle für das Monomer etwas höhere Werte von 146 [222] bzw. 148 kDa [223]



angeben. Dieser Unterschied zwischen dem hier bestimmten Wert und den Literaturwerten lässt sich durch die nötige Extrapolation der Kalibriergeraden erklären. Diese ließ sich nicht vermeiden, weil keine größeren Modellproteine zur Säulenkalibrierung zur Verfügung standen.

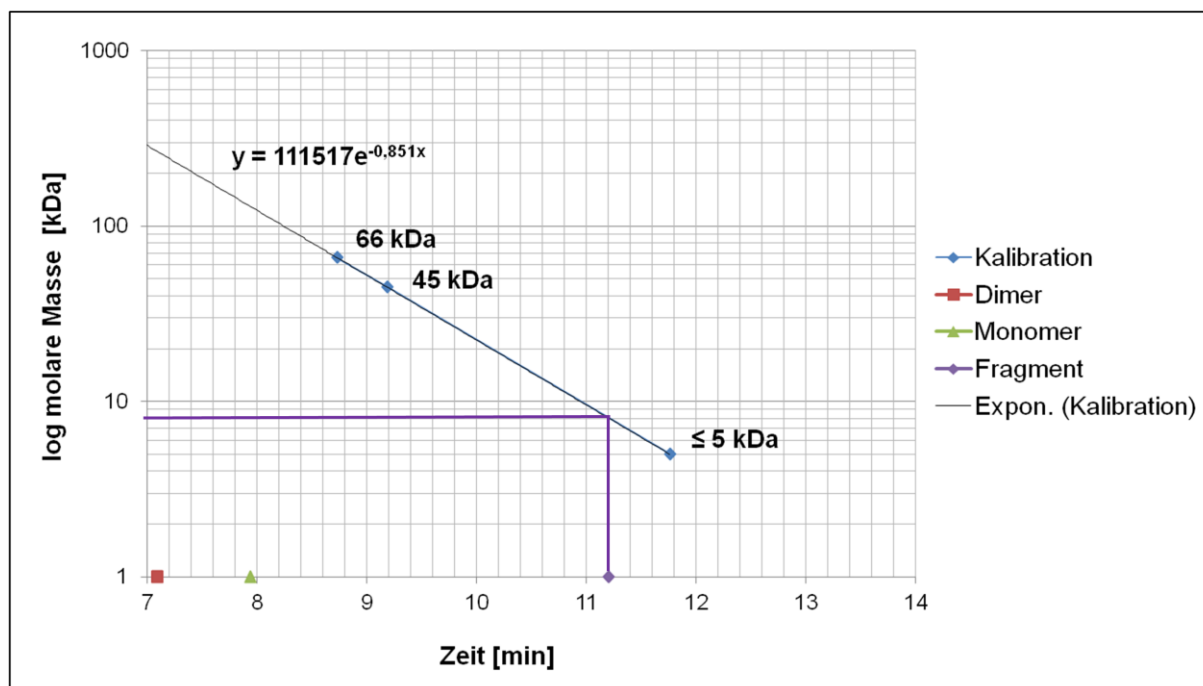


Abb. 3-19 Kalibration der zur Antikörpertrennung verwendeten BioSep™ s-3000 Säule von Phenomenex; eingesetzt wurden hierfür Ovalbumin (45 kDa), BSA (66 kDa) und Natriumazid (≤ 5 kDa); auf der x-Achse sind die Retentionszeiten der Einzelkomponenten der Antikörpertrennung aufgetragen, sodass deren Masse direkt an der y-Achse abgelesen werden kann; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.4

### 3.2.5.2 Präzision der SEC-Trennung des monoklonalen Antikörpers

Die Ergebnisse der Präzisionsmessungen der verwendeten Antikörpermethode sind in Tab. 3-11 dargestellt. Wie auch schon für die Proteintrennung mit der SEC wurden gute Präzisionswerte sowohl für die Retentionszeiten als auch für die Peakflächen, welche sich für die Qualitätskontrolle eignen, erhalten. Hervorzuheben sind hierbei die sehr guten Werte der relativen Standardabweichung der Retentionszeiten an unterschiedlichen Tagen, die sogar in Bereiche für „normale“ APIs (wirksamer Bestandteil eines Arzneistoffes, engl.: active pharmaceutical ingredient) gelangen [173,183]. Hierbei fällt allerdings auch auf, dass die RSD % der Peakflächen für Dimer und Fragment höher sind, als für das Monomer. Dieses kann durch die kleineren Peaks und das daraus resultierende deutlich kleinere Signal-Rausch-Verhältnis erklärt werden, was eine exakte Integration und somit auch eine Quantifizierung deutlich erschwert [224,225]. Dieses Phänomen wurde auch bei den Vergleichsdaten aus der pharmazeutischen Industrie zur SEC beobachtet (vgl. Tab. 3-7). Ergänzende Kontrollkarten zur Verdeutlichung dieses Sachverhaltes sind in Abschnitt 7 präsentiert (Abb. 7-3 bis 7-5).

Tab. 3-11 Präzisionsdaten der Retentionszeiten und Peakflächen der Einzelkomponenten sowie der Gesamtfläche der SEC-Trennung des monoklonalen Antikörpers

Peak	Tag-zu-Tag Präzision $t_R$ (RSD % n=60)	Wiederholpräzision Fläche <sub>pooled</sub> (RSD % n=20)	Tag-zu-Tag Präzision Fläche (RSD % n=60)
(1) Dimer	0,201	1,77	2,49
(2) Monomer	0,061	0,663	2,54
(3) Fragment	0,147	3,02	22,7
Gesamtfläche		0,644	1,95

### 3.3 Kationenaustauschchromatographie

Als zweiter Part der Ionenaustauschchromatographie wurde als Ergänzung zur Proteintrennung mit dem starken Anionenaustauscher ein schwacher Kationenaustauscher (WCX) eingesetzt. Die Hochleistungsschwachekationenaustauschchromatographie (engl.: high performance weak cation exchange chromatography, HP-WCX) wird schon seit vielen Jahren in der Proteinanalytik eingesetzt [226–228] und ist auch in Form des schwachen Kationenaustauschers oftmals in der pharmazeutischen Industrie vertreten [229]. Auch wenn dieser Trennmechanismus schon seit vielen Jahren „im Geschäft“ ist, hat er doch nicht an Aktualität verloren, da heutzutage die Kationenaustauschchromatographie häufig zur Analyse von monoklonalen Antikörpern verwendet wird [230,231]. Wie schon in der Einführung (vgl. Abschnitt 2.1.2.3) und für die Anionenaustauschchromatographie beschrieben (vgl. Abschnitt 3.1) spielen in diesem Trennmechanismus der pH-Wert der mobilen Phase und die daraus resultierende Oberflächenladung der Proteine eine große Rolle für die Trennung, und muss daher bei der Methodenentwicklung beachtet werden.

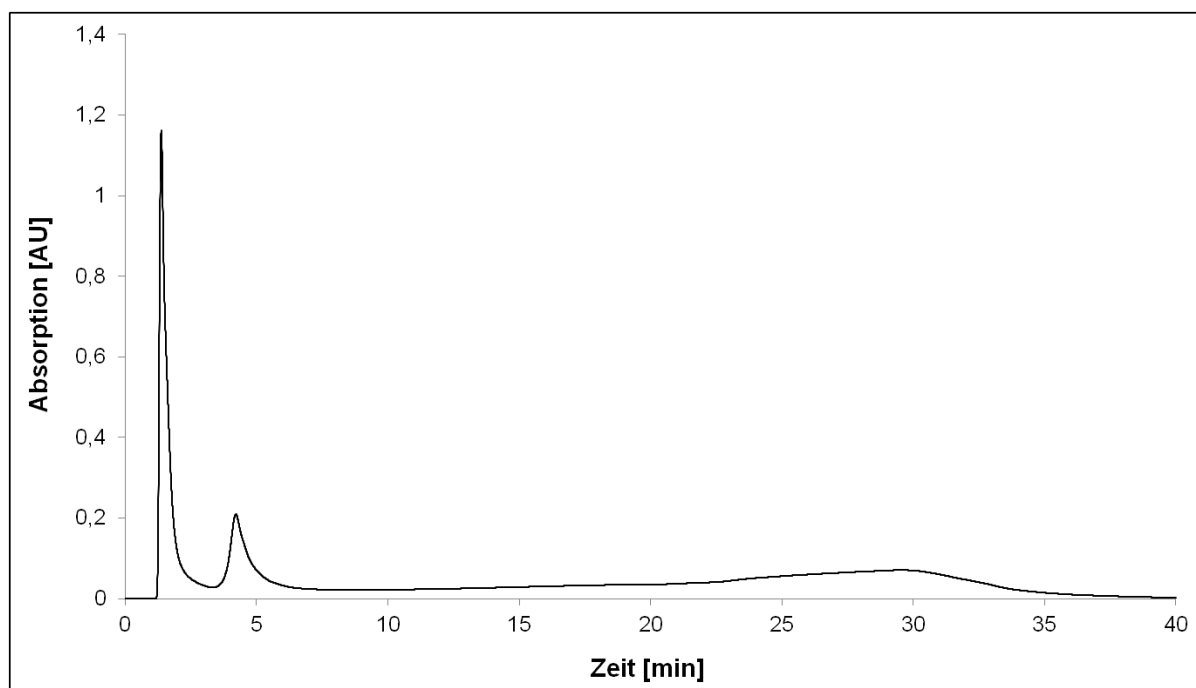
#### 3.3.1 Methodenentwicklung Modellproteine

Da ein Vergleich der unterschiedlichen Trennmechanismen im Vordergrund stand, nachdem schon gezeigt werden konnte, dass präzise Proteinanalytik mit der HPLC möglich ist (vgl. Abschnitt 3.1 und 3.2) wurde zunächst versucht eine Methode für die bisher in den anderen Trennmechanismen eingesetzten Modellproteine Myoglobin, Ovalbumin und Bovines Serum Albumin zu erarbeiten, da dieses auch mit der Anionenaustauschchromatographie möglich war (vgl. Abschnitt 3.1.3).

#### 3.3.2 Myoglobin und Ovalbumin und Bovines Serum Albumin

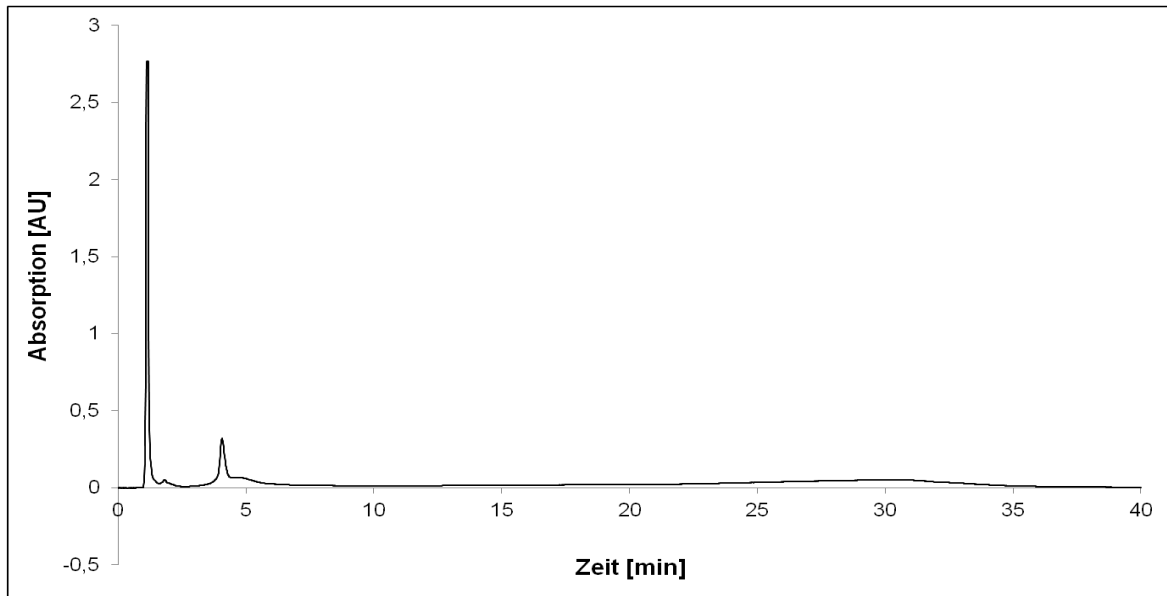
Für den beschriebenen Ansatz wurde zunächst nach schon vorhandenen Applikationen recherchiert. Einer Methode vom Säulenhersteller Dionex [232] wurden für die ersten Testläufe der Gradient und die mobile Phase entnommen. Die Ionenstärke des eingesetzten Phosphatpuffers wurde allerdings von 10 mM auf 20 mM heraufgesetzt, da hierdurch nicht nur Wechselwirkungen zwischen den Proteinen verringert werden [78], sondern auch Dionex selbst eine Mindestionenstärke von 20 mM als Kriterium für die optimale Auflösung angibt [233]. Der beschriebene Salzgradient wurde mit der Änderung übernommen, dass nicht nach dem Gradienten von 100 % bis 68 % Eluent A in 14 min sofort zurück zu Startkonditionen equilibriert wurde, sondern diese Komposition noch zwei Minuten gehalten wird, damit ggf. noch eine Elution erfolgen kann. Weiterhin schloss sich eine Reinigung der Säule nach

jedem Lauf an, bei der die Ionenstärke erhöht wurde in dem mit 100 % Eluent B gespült wurde, um sicherzustellen, dass stärker haftende Proteine von der Säule gewaschen werden. Dieses ist bei einer Methodenentwicklung, bei der das Verhalten der Proteine noch unbekannt ist wichtig, damit die Säule nicht verstopft wird [234]. Für die ersten Versuche wurde der pH-Wert von 6,00 beibehalten, obwohl dieser theoretisch nicht optimal für die vorhandenen Modellproteine mit den isoelektrischen Punkten von 4,9 für Ovalbumin, 4,2-4,9 für BSA und 6,99 für Myoglobin [100] geeignet schien. Bei diesem pH-Wert verfügen theoretisch Ovalbumin und BSA über die gleiche Nettoladung, sodass eine Trennung nicht möglich sein dürfte. Da allerdings in der Ionenaustauschchromatographie viele Parameter berücksichtigt werden müssen und oft eine Voraussage des Elutionsverhaltens laut Meyer [77] nicht möglich ist, wurden die Messungen zunächst bei diesem pH-Wert durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine jeweils einzeln vermessen, um zu identifizieren, welche Retentionszeiten sie haben, bevor Testläufe mit dem Proteingemisch erfolgten. Hierbei zeigte sich jedoch, dass – in diesem Fall – die Theorie bestätigt wurde und eine Trennung von Ovalbumin und BSA nicht möglich war. Sie wurden gemeinsam mit einer Retentionszeit von etwa 1,3 min eluiert. Die Retentionszeit von Myoglobin bei dieser Methode betrug etwa 4,70 min. Die Elution von Ovalbumin und BSA erfolgte deshalb so früh, da sie bei diesem pH-Wert über eine negative Nettoladung ( $\text{pH} > \text{pI}$ ) verfügen und aus diesem Grund nicht mit der negativen Säulenoberfläche in Wechselwirkung treten können. Myoglobin hingegen wird später eluiert, da es auf Grund des  $\text{pI}$ -Wertes schon eine teilweise positive Nettoladung besitzen müsste ( $\text{pI}=6,99$ ;  $\text{pH}=6,00$ ) und somit Wechselwirkungen mit der Säule möglich sind. Im Rahmen dieser ersten Probeläufe wurde erneut eine Wellenlänge von 214 nm als die beste Detektionswellenlänge statt 254 oder 280 nm identifiziert (vgl. Diskussion in Abschnitt 3.1.3). Obwohl die Messungen bei pH 6,00 zu keinem Erfolg führten, wurde noch der schon in der nicht-idealen SEC verwendete 17-18 mM Phosphatpuffer mit pH 6,35 als mobile Phase getestet, trotzdem die Ionenstärke auch unter 20 mM liegt. Ein Beispielchromatogramm von BSA mit dieser mobilen Phase zeigt Abb. 3-20. Hierfür wurde ebenfalls der zuvor beschriebene Gradient verwendet.



**Abb. 3-20 WCX-Analyse von BSA mit Auftrennung in zwei Peaks in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,35; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.1**

Vergleicht man Abb. 3-20 mit dem Chromatogramm der Trennung von Myoglobin, Ovalbumin und BSA (Abb. 3-21), welches unter gleichen Bedingungen aufgenommen wurde, dann wird klar, dass bei diesem pH-Wert keine Trennung zwischen Ovalbumin und BSA erfolgen kann. Diese eluieren gemeinsam als Peak 1 – erkennbar in Abb. 3-21 an der deutlich größeren Peakintensität bzw. Peakfläche im Gegensatz zu Abb. 3-20, wo die gleiche Proteinkonzentration (1 mg/ml) verwendet wurde. Der zweite BSA-Peak aus Abb. 3-20 taucht auch an gleicher Stelle auf, wie das Myoglobin (Abb. 3-21, Peak 2).



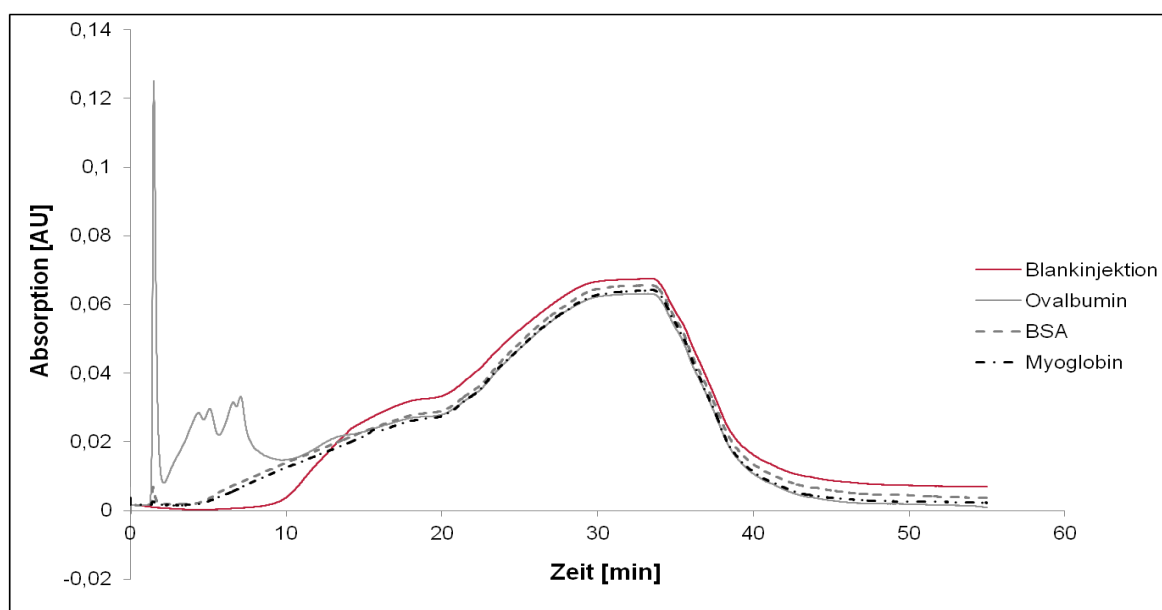
**Abb. 3-21 Repräsentatives WCX-Chromatogramm der Trennung von Myoglobin (Peak 2), Ovalbumin und BSA (gemeinsam Peak 1) in 17-18 mM Phosphatpuffer pH 6,35; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.1**

Es schloss sich die Überlegung an, dass eine Trennung von Ovalbumin und BSA erfolgen könnte, wenn sie mit der Säule wechselwirken würden. Deshalb wurde die Möglichkeit des Einsatzes einer mobilen Phase mit geringerem pH-Wert als die pI-Werte der Proteine in Betracht gezogen. Hieraus sollte eine positive Nettoladung der Proteine resultieren und Wechselwirkungen mit der Säule erfolgen. In diesem Fall wäre theoretisch eine Trennung aller drei Proteine möglich, da Myoglobin auf Grund seines höheren isoelektrischen Punktes dann auch über eine höhere positive Nettoladung verfügt, dementsprechend mehr mit der Säule wechselwirken kann und später eluiert werden sollte. Aus diesem Grund wurde mit unterschiedlichen Puffersystemen (Phosphat- und Citratpuffer) mit einer Ionenstärke von 20 mM und einem pH-Wert von 3,5 (vgl. experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.1) gearbeitet. Die Proteine wurden in diesem Puffer nur einzeln vermessen, da hierbei das Problem auftrat, dass, wenn überhaupt, nur sehr kleine Peaks auftauchten, die sogar über geringere Absorptionen verfügten als der Anstieg der Basislinie auf Grund der Chloridzunahme des Gradienten (genauere Erläuterung des Basislinienanstieges in Abschnitt 3.4.1.2). Aus diesem Grund waren die Signal-Rausch-Verhältnisse zu schlecht um eine Quantifizierung anzustreben (vgl. hierzu Abb. 3-22 zur Verdeutlichung, obwohl hier pH 4,5 verwendet wurde). Dieses ließ sich für den verwendeten Citratpuffer von pH 3,5 relativ leicht erklären, da dieser bei der Messwellenlänge von 214 nm selbst schon über eine Absorption von etwa 0,9 AU verfügt [235], sodass bei der Einstellung des sogenannten „auto zeros“, bei dem der Detektor auf null gestellt wird, schon eine relativ hohe Grundabsorption den Nullwert stellt. Demzufolge müssten die zu vermessenden Proteine selbst eine noch höhere Absorption veranlassen, damit sie detektiert würden. Da dieses offenbar nicht der

Fall war, wurde stattdessen ein Phosphatpuffer pH 3,5 eingesetzt, bei welchem sich aber entgegen der Theorie dasselbe Problem zeigte.

Obwohl der Säulenhersteller Dionex in der Anleitung zur Säule [233] einen pH-Bereich für die Trennsäule von 2 bis 12 angibt, ist der eigentliche Arbeitsbereich der Säule geringer. Grund dafür ist, dass es sich bei deren funktionellen Gruppen für den Ionenaustausch um Carboxylgruppen handelt [236], welche nicht bei allen möglichen pH-Werten über die gleiche Austauschkapazität verfügen. Generell liegt ein schwacher Kationenaustauscher bei pH-Werten von etwa 2 pH-Einheiten unter seinem  $pK_s$ -Wert undissoziiert vor [237]. In dem Fall der Carboxylgruppe liegt der  $pK_s$ -Wert je nach Rest bei etwa 4 bis 5 [238]. Deshalb ist davon auszugehen, dass die funktionellen Gruppen bei pH 3,5 nur wenig dissoziiert vorliegen und dementsprechend nur eine geringe Austauschkapazität der Säule zur Verfügung steht. Mant und Hodges geben den pH-Bereich für Trennungen mit einem schwachen Kationenaustauscher mit 4,5 bis 7,0 an [239]. Aus diesem Grund konnten bei einem pH-Wert von 3,5 keine sinnvollen Ergebnisse erzielt werden. Allerdings konnte nicht vollständig geklärt werden, warum nur so kleine oder gar keine Absorptionen für die Proteine gemessen werden konnten.

Da eine Trennung der Modellproteine bei pH 3,5 nicht möglich war, wurde als weiterer Ansatz zur Trennung aller drei Modellproteine ein pH-Wert von 4,5 verwendet. Dieser liegt zwischen den isoelektrischen Punkten der beiden „Problemproteine“ und stellt somit einen Kompromiss zwischen der Proteinladung und dem Einsatzgebiet der Säule dar. Des Weiteren konnte man dadurch, dass man gegebenenfalls bei diesem pH-Wert unterschiedliche Nettoladungen der Proteine Ovalbumin und BSA erhalten würde auf eine mögliche Trennung hoffen. Allerdings traten auch in diesem Fall die schon zuvor beschriebenen Probleme der sehr geringen Absorptionen trotz eigentlich genügend hoher Konzentration auf (vgl. Abb. 3-22). Hier ist wie schon zuvor beschrieben derselbe Gradient verwendet worden, der den Anstieg der Basislinie verursacht. Dieses wurde durch eine Blankinjektion überprüft (Abb. 3-22, rote durchgängige Kurve).



**Abb. 3-22** Repräsentative WCX-Chromatogramme der Einzelmessungen der Modellproteine und einer Blankinjektion in 20 mM Phosphatpuffer pH 4,5 als Eluent A und Eluent B: Eluent A + 1 M Natriumchlorid übereinandergelegt; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.1

Da auch bei diesem pH-Wert keine Peaks für BSA und Myoglobin, sondern nur für Ovalbumin erhalten wurden und der Anstieg der Basislinie verglichen mit den Peaks wiederum recht groß war, wurde zur Erhöhung der Ionenstärke dem Eluenten B statt Natriumchlorid 0,5 M Kaliumdihydrogenphosphat hinzugefügt. Hierbei war zwar der Anstieg der Basislinie geringer, aber es konnten immer noch keine erkennbaren Peaks für Myoglobin und BSA, trotz der eingesetzten Konzentration von 1mg/ml wie zuvor, detektiert werden, was bei pH 6,0 und pH 6,35 hingegen möglich war. Um zu prüfen, ob dieses den verwendeten Proteinproben zu schulden ist, wurden diese und die zugehörigen Puffer UV-metrisch überprüft. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die drei Proteine in allen Puffern in den verwendeten Konzentrationen deutlich bei 214 nm absorbieren (in Phosphatpuffer Absorptionen um 1,5 AU und in Citratpuffer Absorptionen um 0,7 AU), weshalb nicht die Proben fehlerhaft sein konnten, sondern die Methode bzw. der veränderte pH-Wert der Grund sein musste.

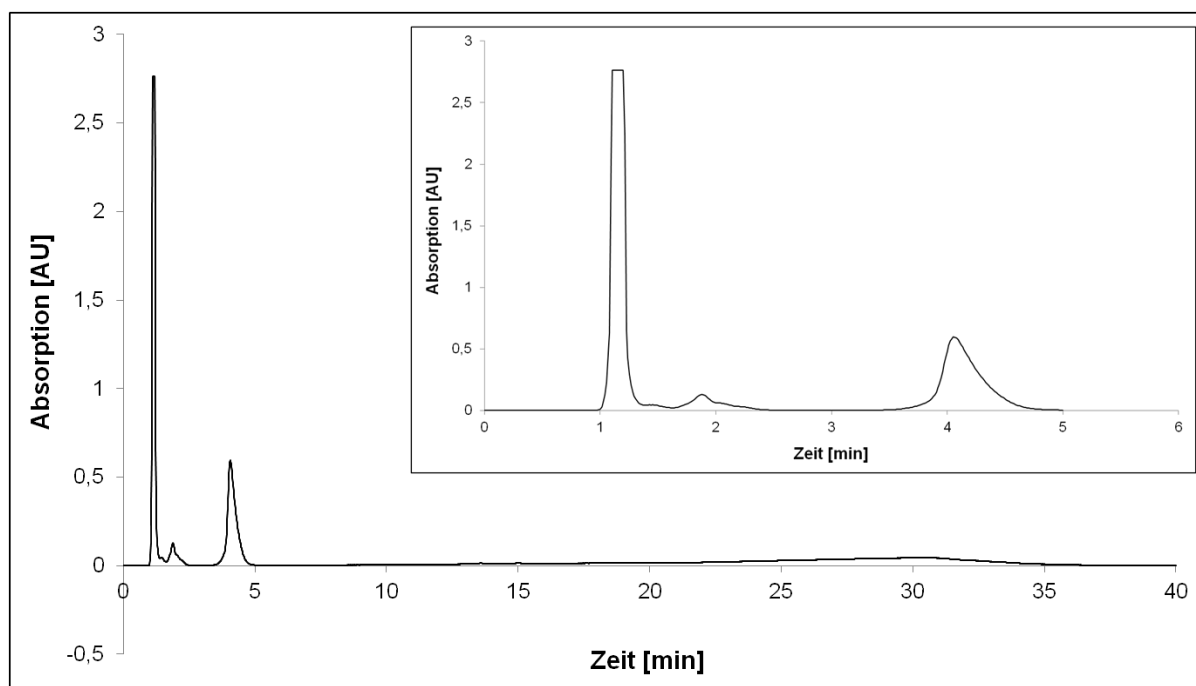
Nachdem alle bisherigen Versuche der Trennung von Ovalbumin und BSA gescheitert waren, schloss sich noch eine weitere Literaturrecherche mit dem Ziel eine Lösung für dieses Problem zu finden an. Allerdings wurden nur in wenigen Publikationen, Ovalbumin und BSA gemeinsam in einem Testgemisch zur Trennung mit einem schwachen Kationenaustauscher verwendet. Ikegami et al. haben beispielsweise, wie zuvor ähnlich versucht, bei einem pH-Wert von 6,9 gearbeitet, sodass auch hier keine Trennung erreicht wurde und die beiden Proteine, wie auch in den oben beschriebenen Versuchen, gemeinsam sehr früh eluierten [240].

Abschließend ließ sich dieses Problem mit der verwendeten Säule nicht lösen, da die isoelektrischen Punkte von Ovalbumin und BSA zu eng beieinander liegen und in dem pH-Bereich, bei dem sie theoretisch trennbar sein müssten die Säule auf Grund ihrer Struktur über keine genügende Trennkapazität verfügt. Aus diesem Grund wurde auch die Möglichkeit der Veränderung des Gradienten nicht weiter verfolgt. Da dieser Trennmechanismus aber in den Vergleich mit einbezogen werden sollte, musste eine alternative Proteintrennung gefunden werden (vgl. Abschnitt 3.3.3 und 3.3.4).

#### **3.3.3 Myoglobin, Ovalbumin**

Nachdem eine Trennung aller drei Modellproteine nicht umsetzbar war, wurde wie in der SEC erfolgreich durchgeführt, versucht nur noch zwei der drei Modellproteine zu trennen. Die Wahl fiel in diesem Fall auf die in der SEC verwendeten Modelle Myoglobin und Ovalbumin, da auch aus den vorher durchgeführten Versuchen (vgl. Abschnitt 3.3.2) hervorging, dass eine Trennung möglich ist. Ein weiterer Aspekt, warum nicht BSA in diese Trennung einbezogen wurde ist, dass dieses wie in Abb. 3-20 dargestellt selbst schon zu zwei Peaks führt, welche dort im Chromatogramm auftauchen, wo auch die Peaks für Myoglobin und Ovalbumin eluieren (vgl. Abb. 3-23). Für diese Methode wurde der zuvor schon getestete Puffer der nicht-idealen SEC mit pH-Werten von 5,0, 5,5 oder 6,0 verwendet, da dieser aus den Vorversuchen gute Ergebnisse erhoffen ließ. Die beste Trennung konnte bei einem pH-Wert von 6,0 erreicht werden, was auch für eine Standardmethode des Säulenherstellers Dionex eingesetzt wird [232]. Das auf diese Weise erhaltene Chromatogramm zeigt, dass eine Trennung von Myoglobin und Ovalbumin möglich ist – bei diesem Beispielchromatogramm allerdings ist die Konzentration des Ovalbumins zu hoch, sodass der Peak abgeschnitten ist, was eine quantitative Auswertung bei der verwendeten Konzentration von 1 mg/ml des Ovalbumins unmöglich macht. Aus diesem Grund wurden die Präzisionsmessungen dieser Methode abweichend von den anderen

Methoden in den verschiedenen Trennmechanismen mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml durchgeführt, was einen Vergleich der unterschiedlichen Mechanismen etwas erschwerte, da andere Konzentrationen betrachtet werden müssen und die Signale nun nicht mehr vergleichbar sind. Bei den Präzisionsmessungen zeigte sich jedoch, dass diese Methode nicht allzu präzise war. Obwohl für Ovalbumin in 10 Läufen eine RSD % der Peakflächen von 0,52 % ermittelt werden konnte, lag die relative Standardabweichung der Peakflächen des Myoglobins bei denselben Läufen bei 17,25 %. An dieser Stelle wäre also noch einige Optimierung und Klärung nötig gewesen, um eine präzise Methode zu erhalten. Durch die im Gegensatz zur SEC deutlich höhere Peakkapazität sollte allerdings eine Methode mit mehr als zwei Modellproteinen entwickelt werden, sodass dieser Ansatz der Trennung von Ovalbumin und Myoglobin nicht weiter verfolgt und eine weitere Methode (vgl. Abschnitt 3.3.4) etabliert wurde.

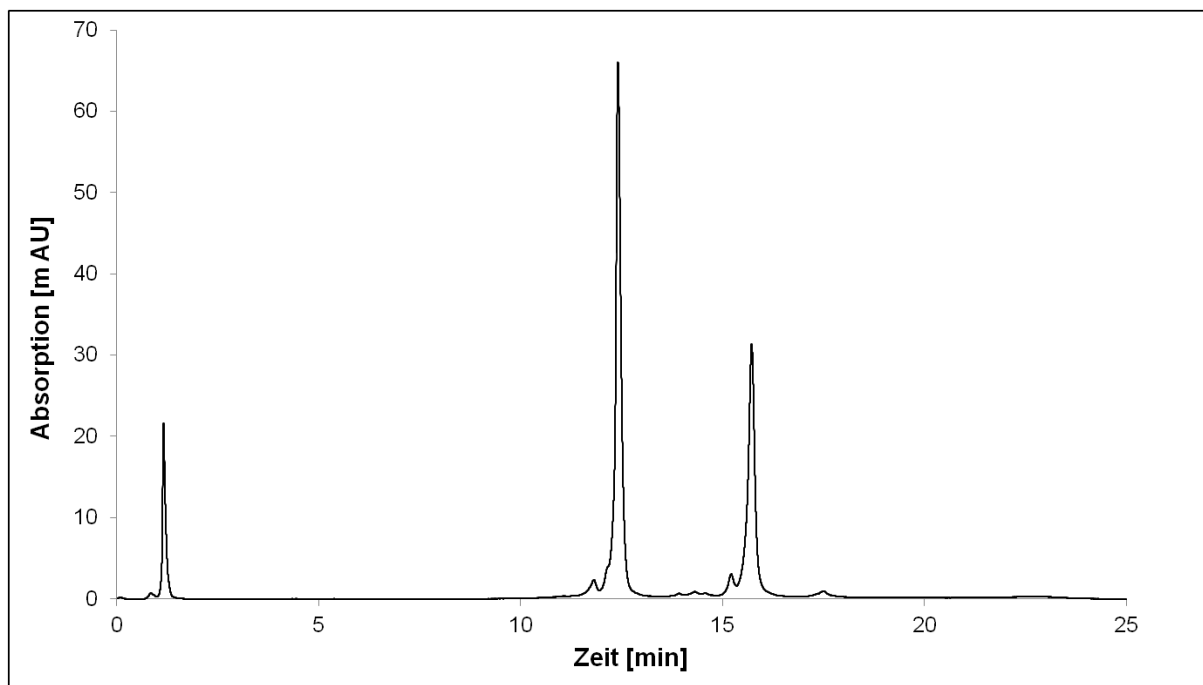


**Abb. 3-23** Repräsentatives Chromatogramm der WCX-Trennung von Myoglobin ( $t_R=4,08$  min) und Ovalbumin ( $t_{R1}=1,12$  min,  $t_{R2}=1,87$  min) in 17-18 mM Phosphatpuffer pH 6,35 mit Vergrößerung des Bereiches von 0 bis 5 min; auffällig ist, dass der Peak nicht komplett detektiert werden konnte, da die Konzentration von Ovalbumin zu hoch ist; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.2

### 3.3.4 Ovalbumin, Cytochrom C und Lysozym

Da die bisher getesteten Methoden mit den zuvor ausgewählten Modellproteinen Myoglobin, Ovalbumin und BSA nicht den gewünschten Erfolg brachten und eine Trennung aller drei Proteine nicht möglich war, wurden Myoglobin und BSA durch andere Modellproteine ersetzt. Um weiterhin einen Vergleich zu den anderen Trennmechanismen zu ermöglichen, wurde Ovalbumin als Modell beibehalten, da dieses in allen anderen Methoden auch analysiert wurde. Als neue Modellproteine wurden Cytochrom C (pI: 10,1) [100] und Lysozym (pI: 11,1) [101] ausgewählt, die durch ihre isoelektrischen Punkte im basischen Bereich insofern geeignet schienen, da sie unter den gewählten Trennbedingungen im neutralen Bereich eine positive Nettoladung aufweisen sollten, was eine Wechselwirkung mit dem verwendeten Kationenaustauscher ermöglichen müsste. Ovalbumin hingegen dürfte bei dem verwendeten neutralen pH-Wert über eine negative Nettoladung verfügen, sodass keine oder nur sehr geringe Wechselwirkungen mit dem Kationenaustauscher stattfinden dürften und eine sehr

schnelle Elution erfolgen sollte. Dieses führt bei den gewählten Modellproteinen dann schon theoretisch zu einer Trennung, da die beiden Proteine mit positiver Nettoladung später eluieren sollten. Diese Theorie konnte praktisch bestätigt werden, indem eine Methode zur Säulenüberprüfung des Herstellers Dionex, bei welcher auch Lysozym und Cytochrom C verwendet werden [232], als Grundlage für die Methodenentwicklung verwendet wurde. Abweichend von der Vorschrift wurde statt eines 10 mM Phosphatpuffers der 17-18 mM (Phosphat-) Puffer der nicht-idealen SEC verwendet (siehe Abschnitt 6.4.2.2 und 6.4.3.3), um durch die höhere Ionenstärke Wechselwirkungen zwischen den Proteinen zu vermeiden (vgl. Abschnitt 3.1.3) [78]. Der pH-Wert von 6,00 wurde beibehalten, aber der beschriebene Salzgradient wurde verändert, indem ein Gradient von 98-68 % A in 14 min verwendet wurde. Die erreichte Zusammensetzung wurde noch drei Minuten gehalten, um die Elution des Lysozyms ( $t_R=15,72$  min) sicherzustellen. Auf diese Weise konnten die „neuen“ Modellproteine allesamt basisliniengetreunt werden. Die zuvor durchgeführte Säulenreinigung durch Anhebung der Ionenstärke nach jedem Lauf wurde für diese Methode unterlassen, da sie auch vom Säulenhersteller ohne diesen Schritt publiziert wurde. Es schloss sich nur die Säulenequilibration an. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abb. 3-24 dargestellt. Verglichen mit der entwickelten SAX-Trennung (vgl. Abb. 3-4) fallen die sehr schmalen, nahezu idealen Peaks auf, was sich im nachfolgenden Vergleich auch in einer hohen Peakkapazität widerspiegelt (vgl. Abschnitt 3.4.1.3). Es wäre auch noch eine Verkürzung der Analysenzeit durch Variation der Flussrate oder des Gradienten möglich, da zwischen den Peaks teilweise noch sehr viel Platz ist.



**Abb. 3-24** Repräsentative WCX-Trennung von Ovalbumin ( $t_R = 1,16$  min), Cytochrom C ( $t_R = 12,41$  min) und Lysozym ( $t_R = 15,72$  min); experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.3

#### 3.3.4.1 Präzision der WCX-Trennung von Ovalbumin, Lysozym, Cytochrom C

Analog zu den anderen vorgestellten Trennmechanismen und Methoden wurden auch mit der WCX Präzisionsmessungen der entwickelten Methode zur Trennung von Ovalbumin, Lysozym und Cytochrom C durchgeführt. Die Ergebnisse der Präzision der Peakflächen sind gemeinsam mit den ermittelten Bestimmungsgrenzen für die einzelnen Proteine in Tab. 3-12 präsentiert. Hierbei fällt auf, dass die Präzision an einem Tag ( $n=20$ ) in einem ähnlichen



Bereich liegt wie bei der SAX und nur für das Cytochrom C die Forderung von unter 2 % relativer Standardabweichung erreicht werden konnte, das Lysozym allerdings nur knapp darüber liegt. An dieser Stelle wäre also noch Optimierungsbedarf, wenn gewünscht. Bei den Werten für die Tag-zu-Tag Standardabweichung hingegen sind für die beiden angesprochenen Proteine Werte um 2 % erreichbar. Aus den geringen Unterschieden zwischen der Wiederholpräzision und der Tag-zu-Tag Präzision kann geschlossen werden, dass die Schwankungen zwischen den Tagen sehr gering waren und sich auch die Probenvorbereitung nicht sehr stark auf die Präzision ausgewirkt hat.

**Tab. 3-12 Präzisionsdaten der Peakflächen und ermittelte Bestimmungsgrenze (LOQ) der Proteintrennung mit dem schwachen Kationenaustauscher**

	<b>Wiederholpräzision Fläche<sub>pooled</sub> (RSD% n=20)</b>	<b>Tag-zu-Tag Präzision Fläche (RSD% n=60)</b>	<b>LOQ</b>
<b>Ovalbumin</b>	3,21	3,46	<10 µg/ml
<b>Cytochrom C</b>	1,76	1,90	<10 µg/ml
<b>Lysozym</b>	2,12	2,09	<10 µg/ml

### 3.3.5 Methodenentwicklung Antikörper

Für die Methodenentwicklung wurden nach Literaturrecherche drei vielversprechende Methoden, mit unterschiedlichen Puffersystemen, ausgewählt (siehe Tab. 3-13) und getestet. Einziger Unterschied zu den publizierten Methoden war jeweils die Säulentemperatur. Alle Methoden wurden abweichend von den Vorschriften bei Raumtemperatur angewandt, um sicherzustellen, dass der Antikörper unter Temperatureinwirkung keine Aggregate bildet, sich verändert oder gar zersetzt [25,241].

Trotzdem die Trennungen der Modellproteine mit diesem Trennmechanismus am erfolgreichsten in Phosphatpuffer durchgeführt werden konnten, wurde für die Analyse des monoklonalen Antikörpers nur ein beschriebener Phosphatpuffer eingesetzt. Zwei weitere Puffersysteme basieren auf der Verwendung von 4-Morpholinoethansulfonsäure-Puffern (MES-Puffern), welche lt. einer Applikation vom Säulenhersteller Dionex [242] zu einer besseren Auflösung führen und neben Phosphatpuffern [243,244] häufig für die Analyse von monoklonalen Antikörpern zum Einsatz kommen [245].

Bei den in Tab. 3-13 vorgestellten und verwendeten Methoden fällt auf, dass durch sie unterschiedliche pH-Werte abgedeckt wurden. Dieses war nötig, da bisher wenige Informationen über einen geeigneten pH-Wert zur Trennung der vorliegenden Antikörperprobe vorhanden waren und der pH-Wert in der Kationenaustauschchromatographie eine wichtige Rolle spielt. Die aufgeführten Gradienten waren die in der jeweiligen Quelle beschriebenen von denen bei den Trennungen ausgegangen wurde. Die erste Methode mit Phosphatpuffer war nicht explizit für eine Antikörpertrennung, sondern für die Analyse von Proteindeamidierungen am Beispiel von Ribonuclease A publiziert. Hierbei wird die Deamidierung von Asparagin betrachtet. Da solche Deamidierungen aber häufig auch bei rekombinanten Proteinen wie monoklonalen Antikörpern zu finden sind, war dies ein sinnvoller Ausgangspunkt für eine Methode.

Da ein Dioden-Array Detektor verwendet wurde, konnten immer gleichzeitig Chromatogramme bei 214, 254 und 280 nm aufgenommen werden. Alle hier präsentierten Chromatogramme wurden bei 214 nm aufgenommen, da dieses, wie zuvor bei den Trennungen der Modellproteine diskutiert, die besten Ergebnisse lieferte.

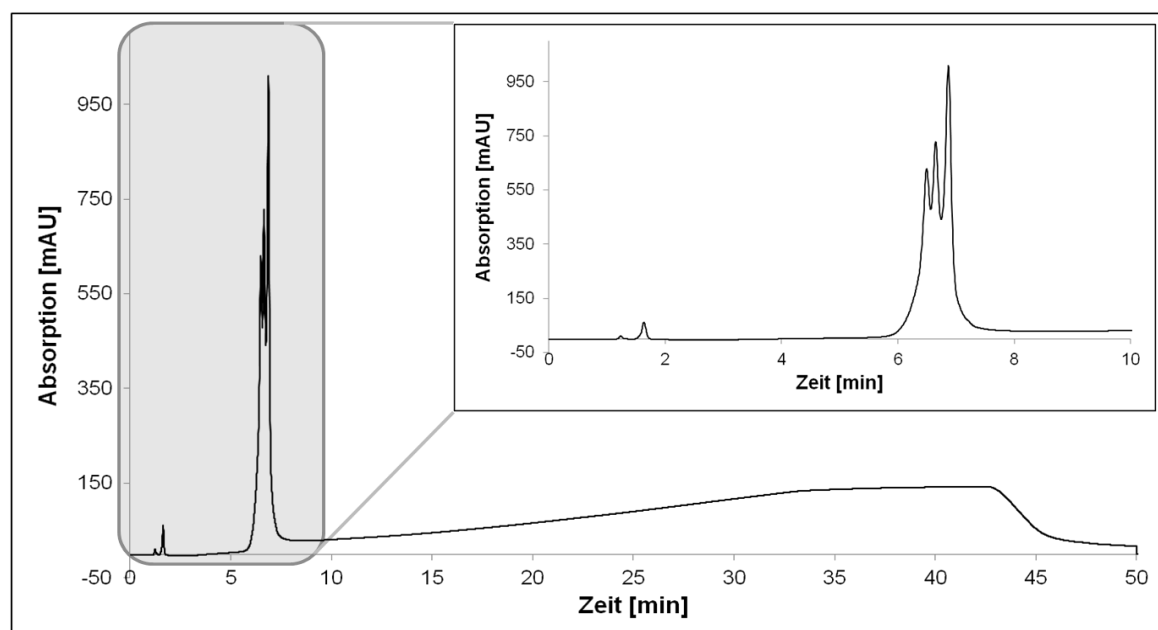
**Tab. 3-13 Getestete Ausgangsmethoden während der Methodenentwicklung für den monoklonalen Antikörper mit WCX; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4**

	<b>Methode 1 [242]</b>	<b>Methode 2 [246]</b>	<b>Methode 3 [247]</b>
<b>Eluent A</b>	10 mM Phosphatpuffer	20 mM MES-Puffer + 60 mM NaCl	20 mM MES-Puffer
<b>Eluent B</b>	Eluent A + 1 M NaCl	20 mM MES-Puffer + 180 mM NaCl	Eluent A + 200 mM NaCl
<b>pH-Wert</b>	6,0	5,5	6,5
<b>Gradient</b>	4-70 % B in 30 min	55-85 % B in 50 min	0-35 % B in 35 min

#### 3.3.5.1 Phosphatpuffer

- **Methode 1**

Das mit der Ausgangsmethode unter Verwendung des oben aufgeführten Phosphatpuffersystems erzielte Chromatogramm ist in Abb. 3-25 präsentiert. Hierbei fällt auf, dass bei der recht langen Laufzeit des Gradienten von 30 min die Elution der Peaks des Antikörpers bereits bei etwa sieben Minuten erfolgt. Des Weiteren lässt sich nur erahnen, dass es sich nicht nur um einen Peak, sondern um drei nicht vollständig getrennte Peaks handelt, was durch eine Vergrößerung des entsprechenden Bereiches zwischen null und zehn Minuten bestätigt wird.

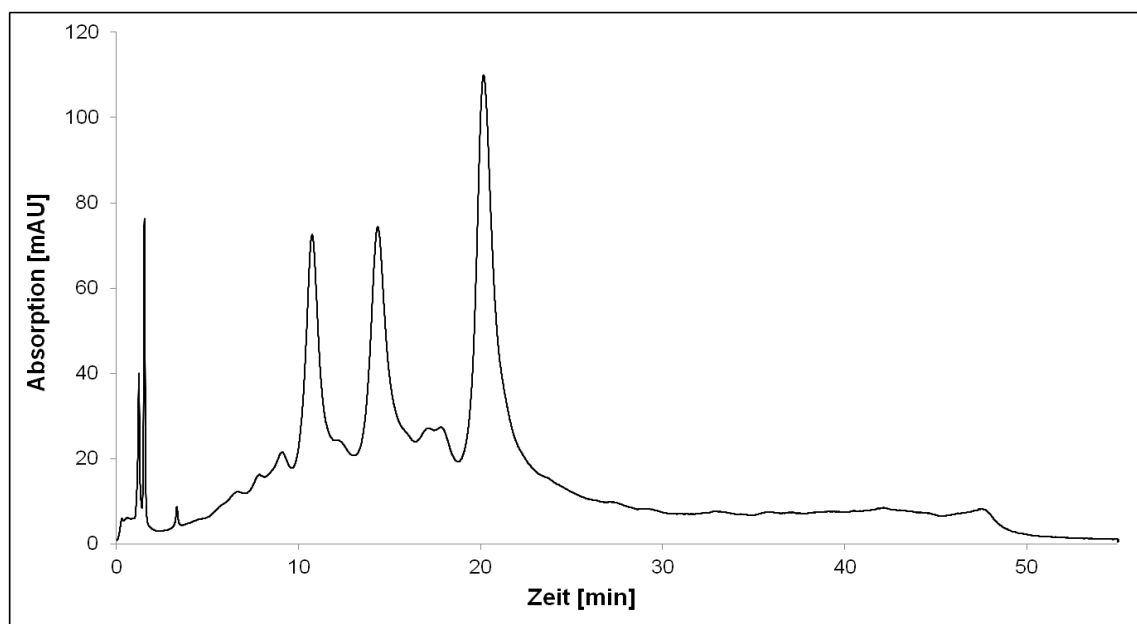


**Abb. 3-25 Repräsentatives Chromatogramm der Ausgangsmethode zur Antikörpertrennung mit Phosphatpuffer (Gradient: 4-70 % B in 30 min) nach Dionex Application note 125 [242] und Vergrößerung des markierten Bereiches wodurch nun Ansätze von drei Peaks erkennbar; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4**

Diese beiden Aspekte zeigen, dass die angewendete Methode noch nicht ideal für die Antikörperanalyse ist und eine Optimierung zur Verbesserung der Auflösung unumgänglich ist, da hierbei keine getrennte Auswertung der einzelnen Peaks möglich ist. Um Fortschritte während der Methodenentwicklung nicht nur visuell durch das Chromatogramm, sondern auch anhand von Werten feststellen zu können, kam an dieser Stelle das Peak-Tal-Verhältnis zum Einsatz, da dieses lt. Ph. Eur. bei nicht basisliniengetrennten Peaks anstelle der Auflösung angewendet werden soll [80]. Die für das Peak-Tal-Verhältnis ermittelten Werte waren auch für den Vergleich zwischen Phosphat- und MES-Puffer hilfreich. Für das in Abb. 3-25 präsentierte Chromatogramm beträgt das Peak-Tal-Verhältnis zwischen Peak 1 und 2: 1,31 und zwischen Peak 2 und 3: 1,70.

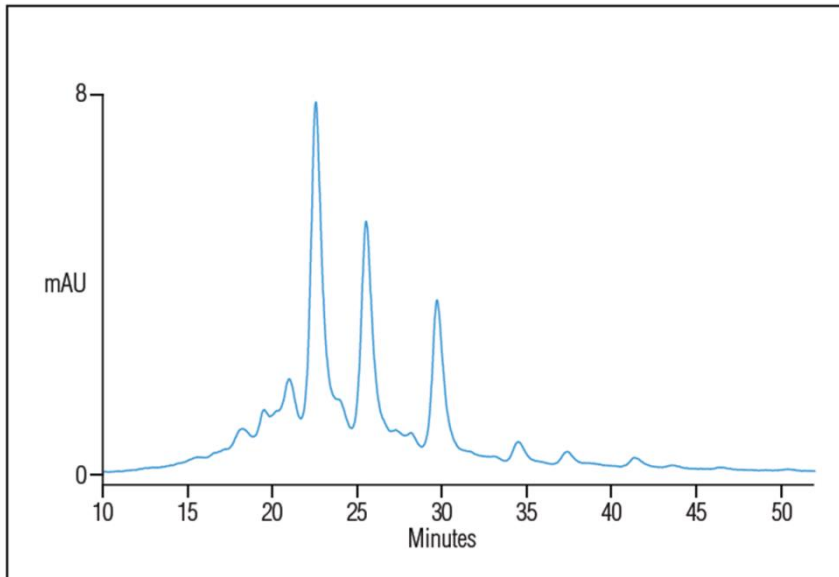
Zunächst wurde versucht, unter Herabsetzung der Flussrate von 1 ml/min auf 0,5 ml/min und Beibehaltung der sonstigen Parameter, eine Verbesserung zu erzielen. Diese war leider wenig erkennbar, wenn man die Peak-Tal-Verhältnisse zwischen Peak 1 und 2 von 1,49 und zwischen Peak 2 und 3 von 1,91 verglichen mit den zuvor präsentierten betrachtet, sodass nun die zuvor nur schlecht erkennbaren drei Peaks deutlicher wurden, aber keine wirklich deutliche Verbesserung der Auflösung festgestellt werden konnte.

Da der Erfolg bei Herabsetzung der Flussrate nur gering war, wurde anschließend versucht durch Veränderung des Salzgradienten unter Verwendung des gleichen Puffersystems eine höhere Selektivität zu erlangen. Hierfür wurde genauer betrachtet, bei welcher Gradientenzusammensetzung die Elution des Antikörpers erfolgt und dieser Bereich auf ein immer längeres Zeitintervall ausgedehnt, sodass die Peaks mit größerem Abstand voneinander durch den langsamen Gradienten eluiert werden konnten. Hierfür wurden einige Zwischenschritte getestet bei denen das Peak-Tal-Verhältnis schon stetig verbessert werden konnte, bis letztendlich bei einem Gradienten von 7-10 % Eluent B in 40 Minuten das in Abb. 3-26 dargestellte Chromatogramm erhalten wurde. Es sind neben den drei deutlich voneinander getrennten Hauptpeaks noch weitere kleine Nebenpeaks erkennbar. Das Peak-Tal-Verhältnis beträgt in diesem Chromatogramm für Peak 1/2: 3,86 und 4,21 für Peak 2/3.



**Abb. 3-26** Beispielchromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit WCX in Phosphatpuffer pH 6,0; verändert wurde im Vergleich zur Ausgangsmethode (siehe Abb. 3-25) nur der Gradient auf 7-10 % B in 40 min, was eine deutlich bessere Auflösung zur Folge hat; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4

Somit konnte durch Veränderung des Gradienten eine deutliche Steigerung der Selektivität erreicht werden, die nun vergleichbar mit dem in einer Applikation von Dionex präsentierten Chromatogramm ist (vgl. Abb. 3-27). Allerdings mit den Unterschieden, dass bei der entwickelten Methode bei Raumtemperatur gearbeitet und nicht wie von Dionex beschrieben mit einer Säulentemperatur von 30 °C und dass die Elution bei der entwickelten Methode schneller erfolgt. Dieses fällt nicht sofort ins Auge, da bei der von Dionex publizierten Abbildung 3-26, die ersten 10 Minuten nicht im Chromatogramm abgebildet sind.

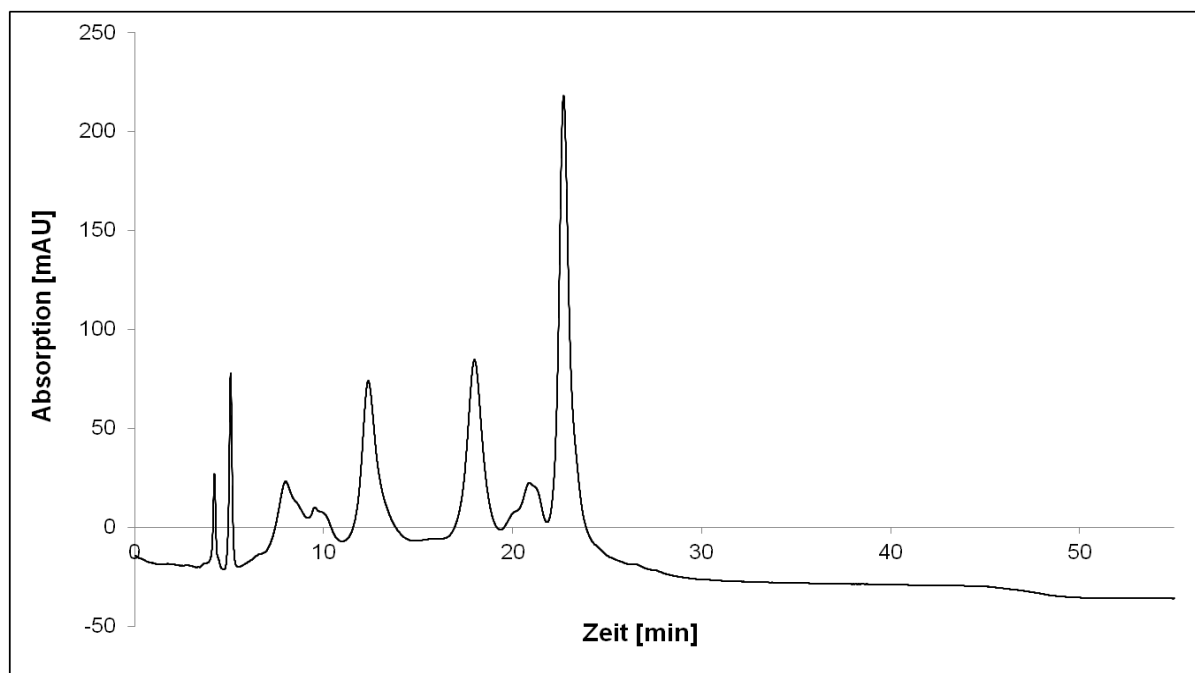


**Abb. 3-27 Vergleichschromatogramm einer Antikörpertrennung mit WCX unter Verwendung der gleichen Trennsäule; aus und modifiziert nach Dionex Application Note 127 [245]**

An dieser Stelle wird in der Publikation von basisliniengetrenten Peaks des Antikörpers gesprochen, was man bei Betrachtung von Abb. 3-26 und auch des zugehörigen Chromatogrammes der Publikation (Abb. 3-27) nur schwer teilen kann, da normalerweise davon ausgegangen wird, dass die Grundlinie eines Peaks bei null beginnt und auch bei null endet. Hierzu muss man einräumen, dass man bei Veränderung der Lage der Basislinie schon von basisliniengetrenten Peaks sprechen könnte, wobei dann allerdings die Peaks wirklich einzeln betrachtet werden müssten und der ganze Anstieg bei Abb. 3-26 zwischen 3 und 30 Minuten bzw. bei Abb. 3-27 zwischen etwa 15 und 35 Minuten aus dem die Haupt- sowie die Nebenpeaks hervorgehen, nicht berücksichtigt würde. Man müsste in diesem Fall die Basislinien der Peaks bezogen auf Abb. 3-26 in der Höhe von etwa 20 mAU ansetzen. Da dieses aber nicht der allgemein gültigen Auffassung und Arzneibuchdefinition entspricht, wurde aus diesem Grund weiterhin das Peak-Tal-Verhältnis verwendet und bei den folgenden Präzisionsmessungen zwar die unterschiedlichen Retentionszeiten der drei Hauptpeaks betrachtet, aber nur eine Gesamtpeakfläche herangezogen.

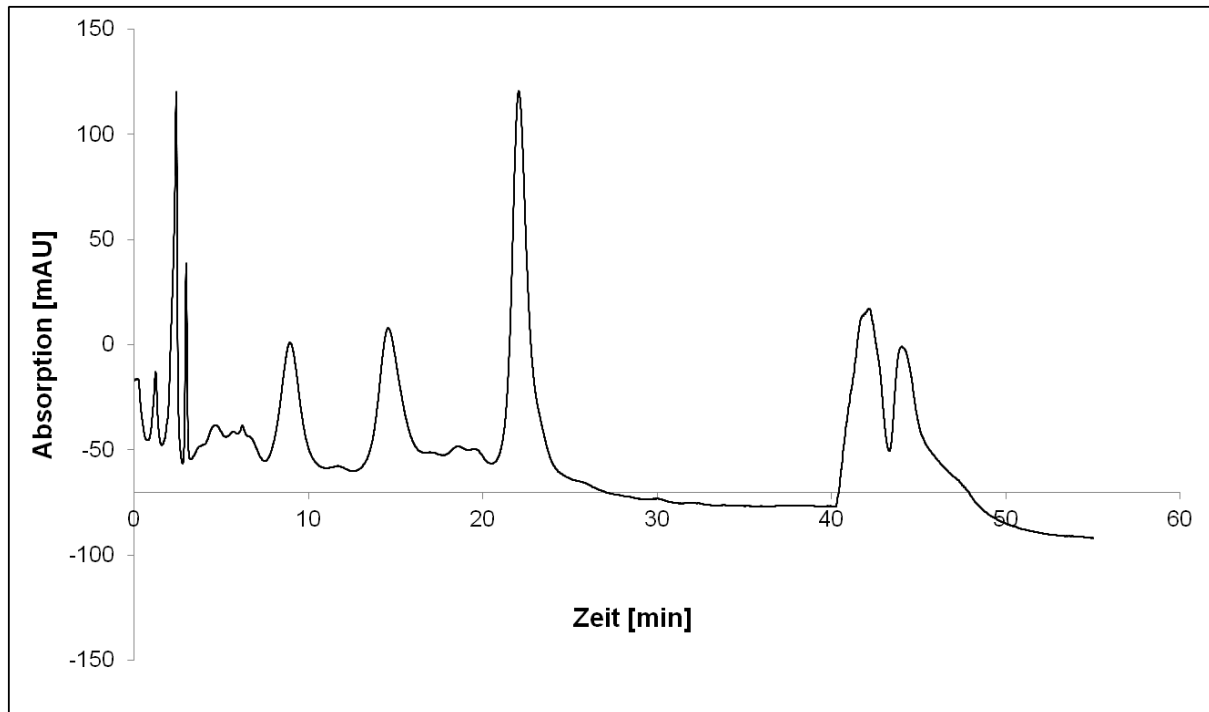
Aus diesem Grund wurde eine weitere Verbesserung mit dem Ziel der „wirklichen“ Basislinientrennung angestrebt. Hierfür wurden verschiedene Ansätze verfolgt, bei denen der entwickelte Gradient (7-10 % Eluent B) beibehalten wurde. Einmal wurde zu der eingesetzten Gradientenelution noch ein Flussratengradient, mit dem Ziel die Elution der einzelnen Komponenten noch besser trennen zu können getestet. Das zugehörige Chromatogramm ist in Abb. 3-28 dargestellt. Auf den ersten Blick erkennt man, dass die drei Hauptpeaks – vor allem Peak 1 und 2 – deutlich besser aufgelöst sind als zuvor (p/v Peak

1/2: 6,00 und Peak 2/3: 4,44), allerdings fällt bei genauerem Hinsehen auf, dass nicht mehr alle zuvor erkennbaren Nebenpeaks im Chromatogramm sichtbar sind. Auffällig ist auch, dass die Basislinie des Chromatogramms nicht mehr wie zuvor bei null Absorptionseinheiten beginnt, sondern darunter.



**Abb. 3-28** Eine weitere Verbesserung der Auflösung im Vergleich zu Abb. 3-25 und Abb. 3-26 zeigt dieses Beispielchromatogramm des Antikörpers bei Trennung mit WCX in Phosphatpuffer pH 6,0; es wurde zu dem neuen Gradienten (7-10 % B in 40 min) noch ein Flussratengradient von 0,25 bis 1 ml/min in 40 min ergänzend angewendet; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4

Dieses Phänomen zeigte sich noch deutlicher bei einem weiteren Optimierungsversuch der Flussrate. In Abb. 3-29 ist ein Beispielchromatogramm mit einer Flussrate von 0,5 ml/min dargestellt. Hierbei ist zu beachten, dass der Schnittpunkt von x- und y-Achse bei – 70 mAU liegt, um die Grafik zu verdeutlichen. Neben der Problematik mit dem Beginn der Basislinie fällt auf, dass bei diesem Chromatogramm noch eine Elution nach 40 Minuten erfolgt, also nach Ende des eigentlichen Gradienten. Folglich muss davon ausgegangen werden, dass dieser bei der verwendeten Flussrate im Vergleich zu den vorigen Trennungen nicht ausreicht. Die Elution weiterer Komponenten erfolgt erst bei der Säulenreequibrierung, bei der die Flussrate auf 1 ml/min hoch gesetzt wurde. Zwar konnte die Auflösung zwischen den Peaks in diesem Fall noch verbessert werden, sodass Peak 1 und 2 nun tatsächlich basisliniengetreunt sind, jedoch werden auch nicht alle Komponenten während des eigentlichen Gradienten eluiert. Aus diesem Grund ist hier keine quantitative Aussage möglich. Trotzdem wurden zum Vergleich mit der zuvor entwickelten Methode (vgl. Abb. 3-26) einmal 20 aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt und deren Präzision bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.5.6).

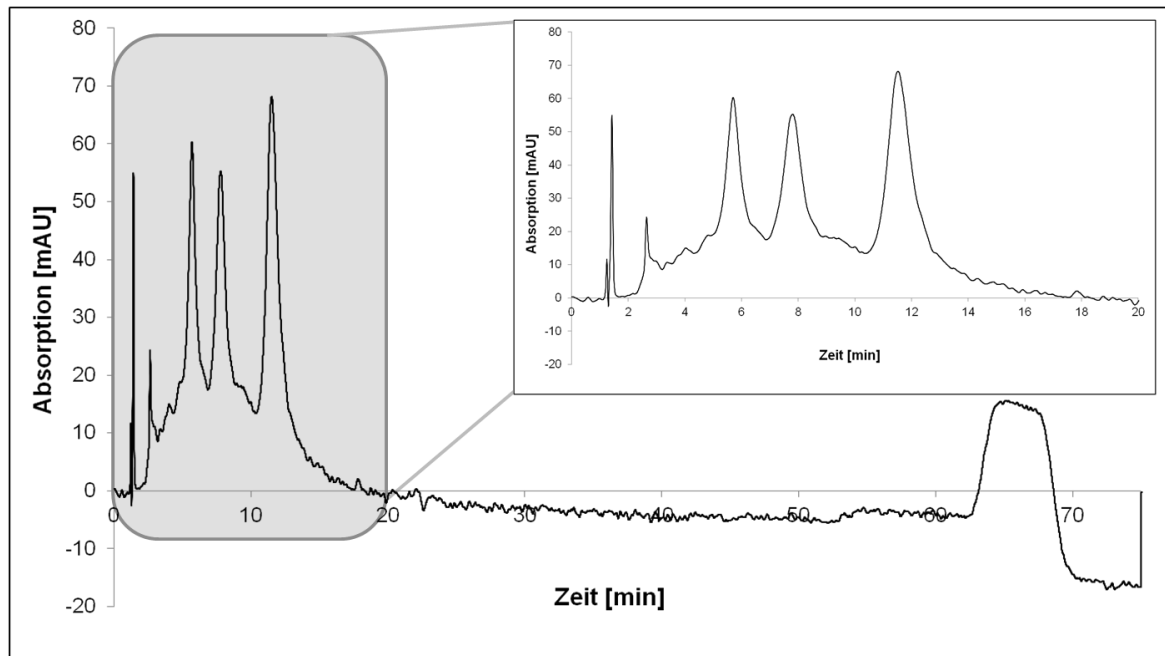


**Abb. 3-29** Beispielchromatogramm zur weiteren Optimierung der Auflösung durch Veränderung der Flussrate (0,50 ml/min ohne Gradient) bei der Antikörpertrennung mit WCX in Phosphatpuffer pH 6,0 dem neuen Gradienten (7-10 % B in 40 min); erkennbar ist hier allerdings, dass nach Ende des Gradienten bei 40 min noch eine Elution bei der Säulenreinigung mit höherer Salzkonzentration erfolgt; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4

#### 3.3.5.2 MES-Puffer

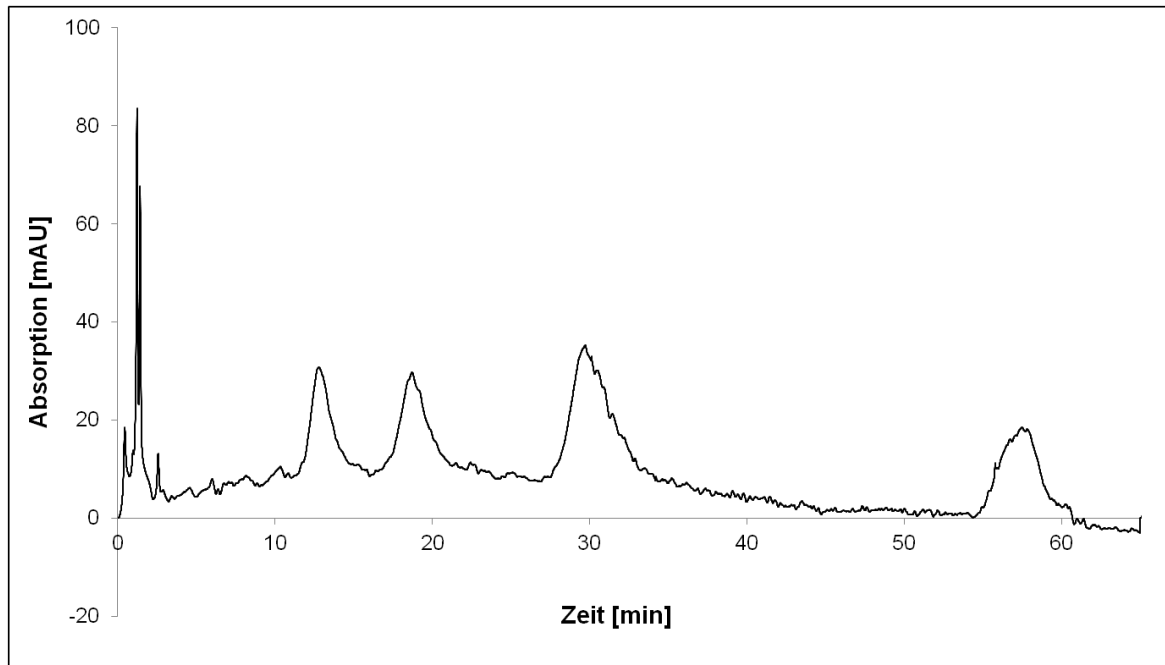
- **Methode 2**

Auch bei diesem Puffersystem wurde zunächst die beschriebene Methode abweichend von der Vorschrift bei Raumtemperatur verwendet. Das auf diese Weise erhaltene Chromatogramm ist in Abb. 3-30 präsentiert. Ähnlich wie zuvor schon bei dem verwendeten Phosphatpuffer, erhält man nach der Totzeit in diesem Fall drei deutlich voneinander getrennte Hauptpeaks, die jedoch sehr früh eluieren, obwohl der eingesetzte Gradient über einen deutlich längeren Zeitraum (50 min) läuft. Vor diesen drei Hauptkomponenten tauchen noch Nebenkompontenten in Form von deutlich kleineren Peaks auf. Da auch in diesem Fall keine Basislinientrennung erreicht wurde (p/v Peak 1/2: 3,37 und Peak 2/3: 4,00), wurde auch bei diesem Puffersystem eine Optimierung zur besseren Auflösung der Peaks angestrebt.



**Abb. 3-30** Repräsentatives Chromatogramm der Ausgangsmethode zur Antikörpertrennung mit MES-Puffer (Gradient: 55-85 % B in 50 min) nach Dionex Anleitung für ProPac WCX-10 und SCX-10 [197] mit Vergrößerung des markierten Bereiches; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4

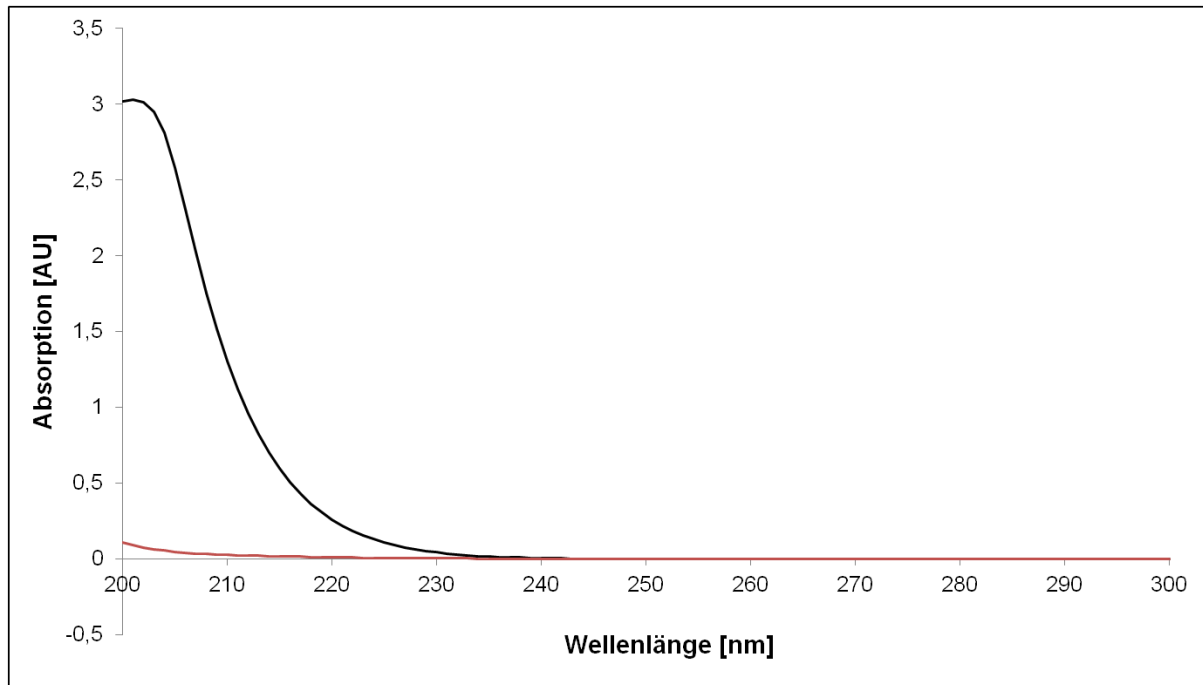
Wie auch bei dem zuvor unter Methode 1 beschriebenen Optimierungsversuch konnte nur durch Herabsetzung der Flussrate auf 0,5 ml/min auch bei dem hier verwendeten MES-Puffer kaum eine bessere Auflösung erreicht werden. Aus diesem Grund wurde auch hier der Gradient optimiert, indem der Bereich des Gradienten bei dem die Elution der Peaks erfolgt immer weiter auseinander gezogen wurde. Dabei wurde die Ionenstärke der Fließmittel nachdem die Elution erfolgt ist nicht weiter erhöht, da dieses nicht nötig war und auf diese Weise die Analysenzeit nicht weiter ausgedehnt werden musste. Das Ergebnis dieser Gradientenoptimierung ist in Abb. 3-31 dargestellt. In diesem Fall konnte noch eine weitere Verbesserung der Selektivität, wenn auch augenscheinlich keine komplette Basislinientrennung (p/v Peak 1/2: 8,00 und Peak 2/3: 9,64) erreicht werden. Wobei hier bei Berechnung der Auflösung auch schon Werte  $> 1,5$  erhalten werden, die lt. Arzneibuch (vgl. Abschnitt 2.2.4) für basisliniengetrennte Peaks und somit eine vollständige Trennung ausreichen.



**Abb. 3-31 Beispielchromatogramm der Antikörpertrennung mit WCX in MES-Puffer mit dem optimierten Gradienten von 48-58 % B in 50 min; erkennbar ist hier die bessere Auflösung zwischen den drei Hauptpeaks (1: 12,79 min, 2: 18,71 min, 3: 29,41 min) aber auch das Rauschen im dritten Hauptpeak bei 29,41 min; experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 6.4.3.4**

Betrachtet man Abb. 3-31 genauer, so fällt auf, dass ein deutlich niedrigeres S/N-Verhältnis, vor allem verglichen mit den Messungen in Phosphatpuffer vorliegt, obwohl bei allen Versuchen die gleiche Konzentration des Antikörpers (2,5 ml/ml) eingesetzt wurde. Der dritte Hauptpeak bei etwa 30 min in diesem Chromatogramm weist im absteigenden Ast sogar Ansätze des Grundrauschens auf und auch das Grundrauschen der Basislinie, welches man bei dieser Antikörperkonzentration in Phosphatpuffer noch nicht einmal erahnen konnte, ist deutlich erkennbar. Dieses deutet darauf hin, dass die Antikörperkonzentration in MES-Puffer schon relativ nah an der Bestimmungsgrenze liegen muss. Eine Klärung dieses Phänomens konnte über UV-Messungen der reinen Puffersysteme erfolgen (Abb. 3-32).





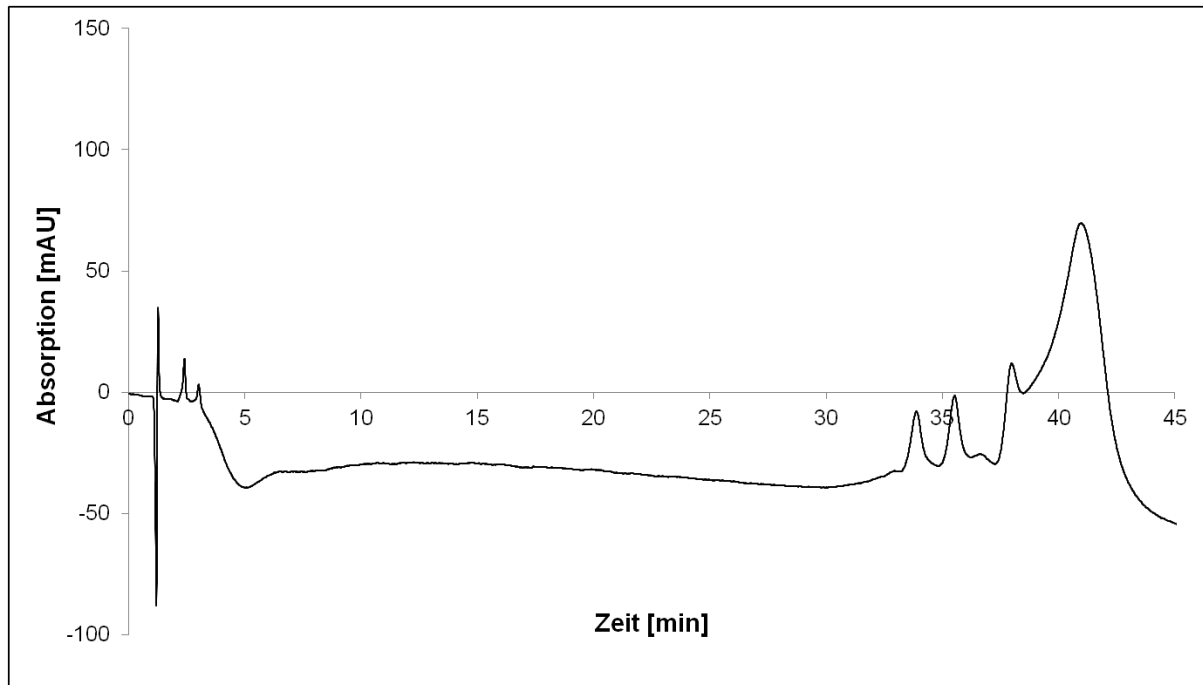
**Abb. 3-32 UV-Spektren aufgenommen von 200 bis 300 nm von MES-Puffer (20 mM MES+60 mM NaCl pH 5,5; schwarze Kurve) und Phosphatpuffer (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 6,0; rote Kurve) aus den beschriebenen Methoden 1 und 2; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4**

Hierbei fällt auf, dass der MES-Puffer bei der betrachteten Messwellenlänge von 214 nm schon eine recht hohe Eigenabsorption von 0,700 AU aufweist, wohingegen für den Phosphatpuffer bei dieser Wellenlänge gerade einmal eine Absorption von 0,018 AU gemessen wurde. Dieses erklärt die Unterschiede der Absorptionen der aufgenommenen Chromatogramme, da vor jeder HPLC-Messung ein sogenannter „auto zero“ erfolgt. Wenn das Fließmittel, wie in diesem Fall der MES-Puffer, nun eine hohe Eigenabsorption aufweist die korrigiert wird, erscheinen die gemessenen Substanzpeaks dann dementsprechend auch deutlich kleiner. Dieses erklärt das bei der Diskussion von Abb. 3-31 angesprochene Grundrauschen und die kleineren Signale.

Die Präzision der unterschiedlichen Methoden mit Phosphat- und MES-Puffer wird in Abschnitt 3.3.5.6 diskutiert.

- **Methode 3**

Wie bei den beiden zuvor beschriebenen Methoden 1 und 2, wurde die gefundene Literaturmethode mit den entsprechenden Fließmitteln zur Gradientenelution verwendet. Dabei wurde das in Abb. 3-33 dargestellte Chromatogramm erhalten. In diesem treten wie auch bei den vorigen Methoden ebenfalls drei, wenn jedoch hier sehr kleine, Peaks auf. Allerdings bei dem hier betrachteten Chromatogramm teilweise erst nach Ende des angewandten 35-minütigen Gradienten. Der letzte Peak nach 40 Minuten ist dem Gradienten und somit der Reequilibrierung der Säule geschuldet. Weiterhin fällt auf, dass die Basislinie des Chromatogrammes nahezu die ganze Analysenzeit eine negative Absorption aufweist.



**Abb. 3-33** Beispielchromatogramm der Antikörpertrennung mit dem schwachen Kationenaustauscher mit WCX; deutlich erkennbar ist die schwankende Basislinie mit negativen Absorptionswerten; die Elution der einzelnen Peaks erfolgte erst ganz am Ende des verwendeten Gradienten (0-35 % B in 35 min); der größte vermeintliche Peak bei 41 min ist bedingt durch die Reequilibrierung zu Startkonditionen; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4

Da die getesteten Methoden 1 und 2 gegenüber Methode 3 nach den ersten Läufen ohne vorige Optimierung deutlich bessere Ergebnisse zeigten, wurden diese beiden, wie oben beschrieben optimiert und Methode 3 nicht weiter eingesetzt.

#### **3.3.5.3 Warum gibt der Antikörper 3 Peaks?**

Eine Frage, die schon während der Methodenentwicklung auftauchte, war warum der Antikörper neben kleineren Nebenkompenten in drei, zwar nicht basisliniengetretennte aber deutlich voneinander unterscheidbare, Peaks aufgetrennt werden konnte. Dieses Phänomen trat sowohl in Phosphat- (siehe Abb. 3-34) als auch in MES-Puffer (siehe Abb. 3-35) auf, sodass dieses nicht dem Puffersystem, sondern dem Antikörper zugeordnet werden konnte. Aber auch die anderen Peaks der Trennungen in Phosphat- und MES-Puffer mussten identifiziert werden.

Die ersten Peaks beider dargestellter Chromatogramme (Peaks mit Retentionszeiten < 3 min) konnten als Totzeit identifiziert werden, indem statt einer Probe mit Antikörper die gleiche Menge (10 und 25 µl) des reinen Eluenten A eingespritzt wurden, welcher sonst zur Verdünnung der Antikörperproben diente. Da hierbei das gleiche Peakmuster wie in den unten dargestellten Chromatogrammen (Abb. 3-34 und Abb. 3-35) auftauchte, konnten diese Peaks nicht durch den monoklonalen Antikörper bedingt sein.

Durch das Vermessen von Blankinjektionen beider Puffersysteme konnte der jeweils letzte Peak im Chromatogramm – im Phosphatpuffer bei 47,54 min und im MES-Puffer bei 57,01 min – als zum Gradienten zugehörig identifiziert werden. Dieser entsteht durch das Umschalten des Fließmittels zu Startkonditionen zur Reequilibrierung der Säule nach dem eigentlichen Gradienten im jeweiligen Puffersystem.

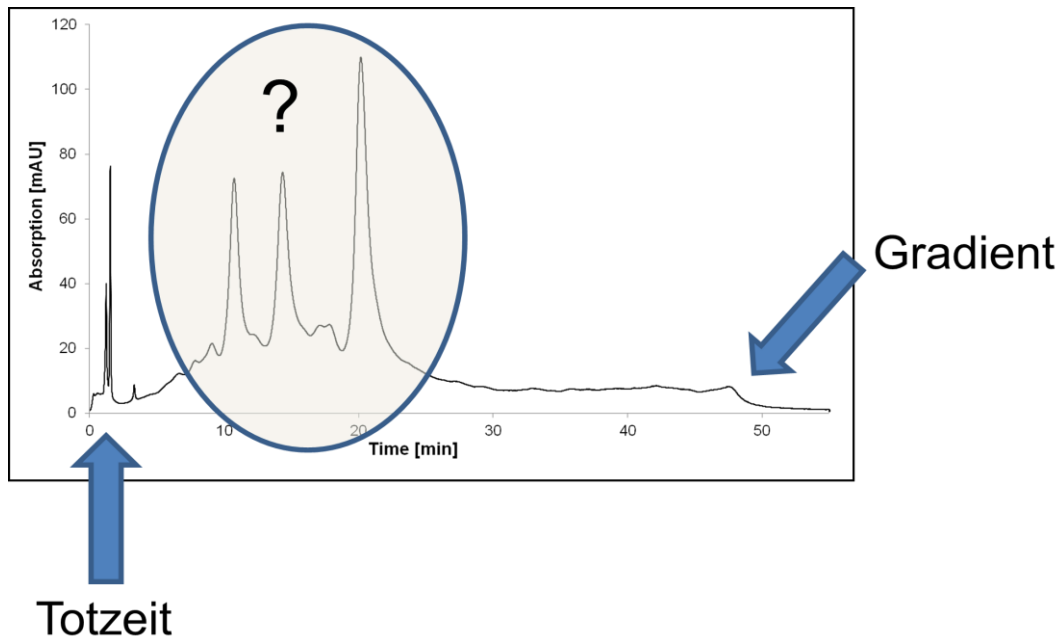


Abb. 3-34 Repräsentatives Chromaogramm der WCX-Antikörpertrennung in Phosphatpuffer mit den identifizierten und noch zu klärenden Peaks

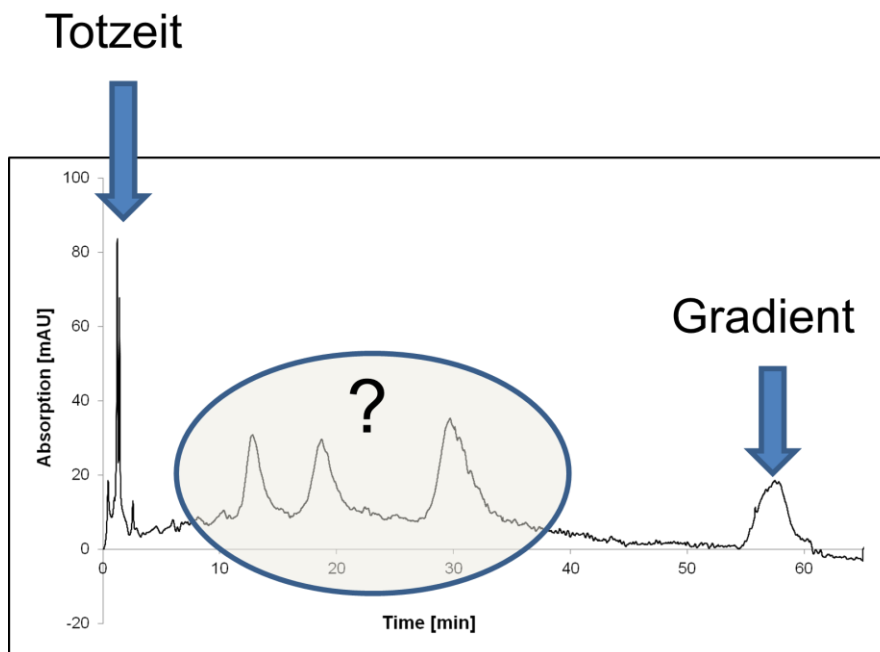


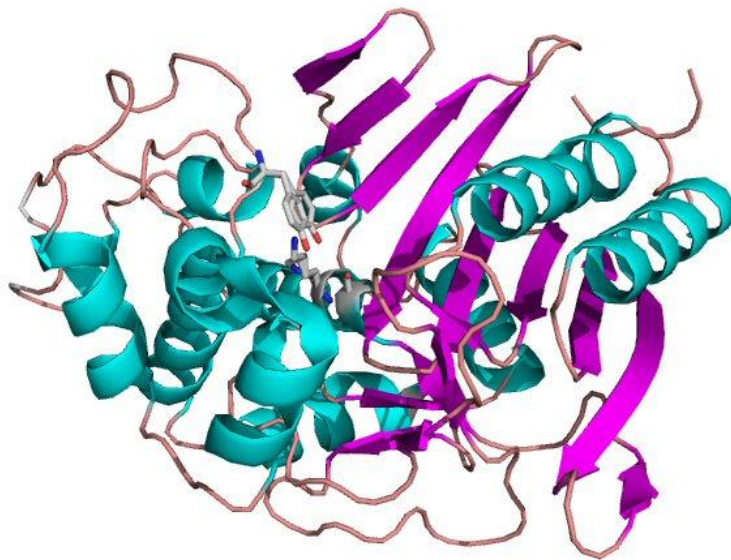
Abb. 3-35 Beispielchromatogramm der Antikörpertrennung mit WCX in MES-Puffer mit den identifizierten und noch zu klärenden Peaks

Durch eine ausführliche Literaturrecherche wurden Hinweise für die mögliche Identifizierung der drei Peaks des Antikörpers gefunden. Weitzhandler et. al [244,248] und Harris [223,249] beschreiben die Möglichkeit, Antikörper mit unterschiedlichen C-terminalen Lysinresten mit Hilfe eines schwachen Kationenaustauschers zu trennen. Dass es sich um Antikörpervarianten mit unterschiedlichen Lysinresten handelt, lässt sich durch Zugabe des Enzyms Carboxypeptidase B klären, welches selektiv diese Lysinreste abspalte (vgl. Abschnitt 3.3.5.4).

#### 3.3.5.4 Zusatz von Carboxypeptidase B

Einer Applikationsvorschrift von Dionex [245] wurde die Probenvorbereitung mit dem Enzym Carboxypeptidase B entnommen (siehe Abschnitt 6.3.3). Allerdings wurde nicht die dort beschriebene Methode mit MES-Puffer und zugehörigem Gradienten verwendet, sondern die zuvor entwickelten und in Abschnitt 3.3.5.1 und 3.3.5.2 diskutierten (vgl. Abb. 3-26 und 3-31) mit Phosphatpuffer und MES-Puffer.

Bei Carboxypeptidase B handelt es sich um eine Metallopeptidase mit einer Masse von 34,3 kDa [250]. Die Enzymstruktur ist in Abb. 3-36 dargestellt. Dieses Enzym katalysiert durch Spaltung von Peptidbindungen die Abspaltung von C-terminalen basischen Aminosäuren. Hierbei werden bevorzugt und spezifisch Lysin- und Argininreste abgespalten [251]. Deshalb kann durch Zusatz von Carboxypeptidase B geklärt werden, ob die nach der Literaturrecherche gefasste Theorie (vgl. Abschnitt 3.3.5.3) bestätigt werden kann.



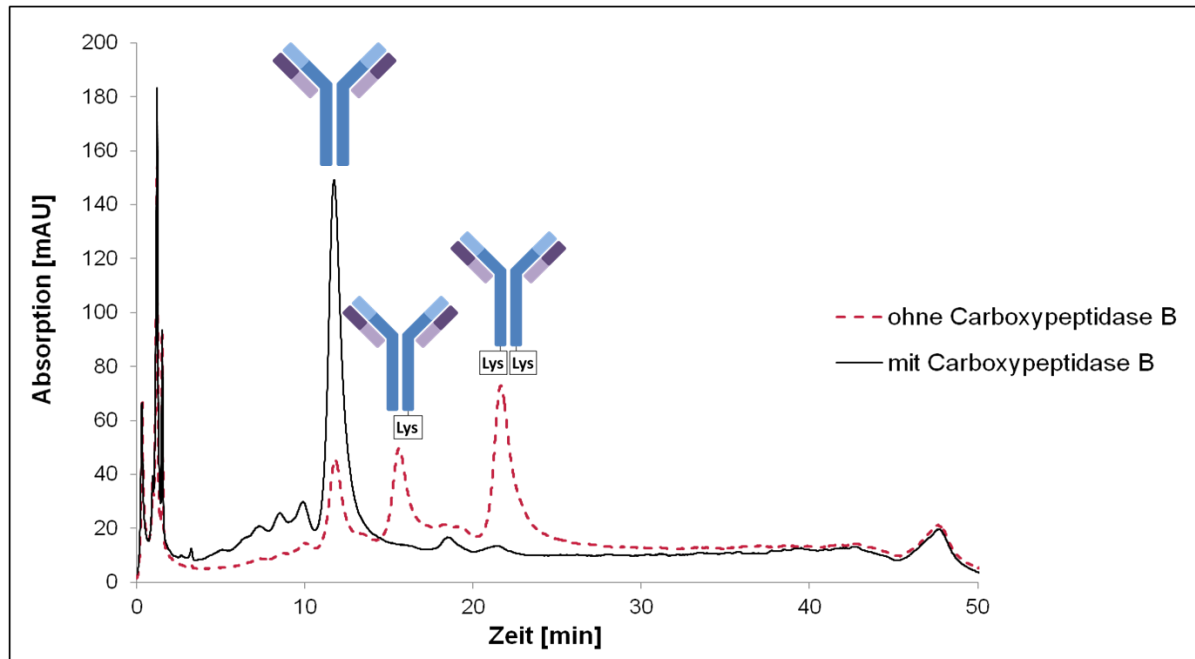
**Abb. 3-36 Carboxypeptidase B; nach Universität Maine [252]**

Der optimale pH-Wert für den Arbeitsbereich des Enzyms wird je nach Quelle zwischen 7,0 und 9,0 angegeben [251,253]. In der Vorschrift von Dionex wurde davon abweichend bei einem pH-Wert von 5,6 gearbeitet und trotzdem erfolgte eine vollständige Abspaltung von Lysin durch das Enzym. Bei den in dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Antikörpertrennung mit WCX wird ein pH-Wert von 6,0 mit dem Phosphatpuffersystem und von 5,5 mit dem MES-Puffersystem verwendet. Dieses liegt zwar nicht im optimalen pH-Bereich des Enzyms, da aber bei der Dionex Applikation ein ähnlicher pH-Wert verwendet wurde, war die Aussicht auf Erfolg relativ hoch.

Da nicht sicher war, ob das neu erworbene Enzym Carboxypeptidase B ordnungsgemäß bei den eingesetzten pH-Werten arbeitet und man sich daher nicht auf dessen Funktion verlassen konnte, wurden immer die eigentliche Probe mit Enzym sowie eine Blindprobe mit Wasser statt des Enzyms parallel vorbereitet und den gleichen Probenvorbereitungsschritten ausgesetzt. Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass sich äußere Einflüsse während der Probenvorbereitung wie beispielsweise Temperaturschwankungen auf das Ergebnis der Analysen auswirken, ohne dass man dieses bemerkt. Nach der erforderlichen Inkubation bei 37 °C von Probe und Kontrolle wurden diese einzeln mit den entwickelten HPLC-Methoden vermessen. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Abb. 3-37 für die

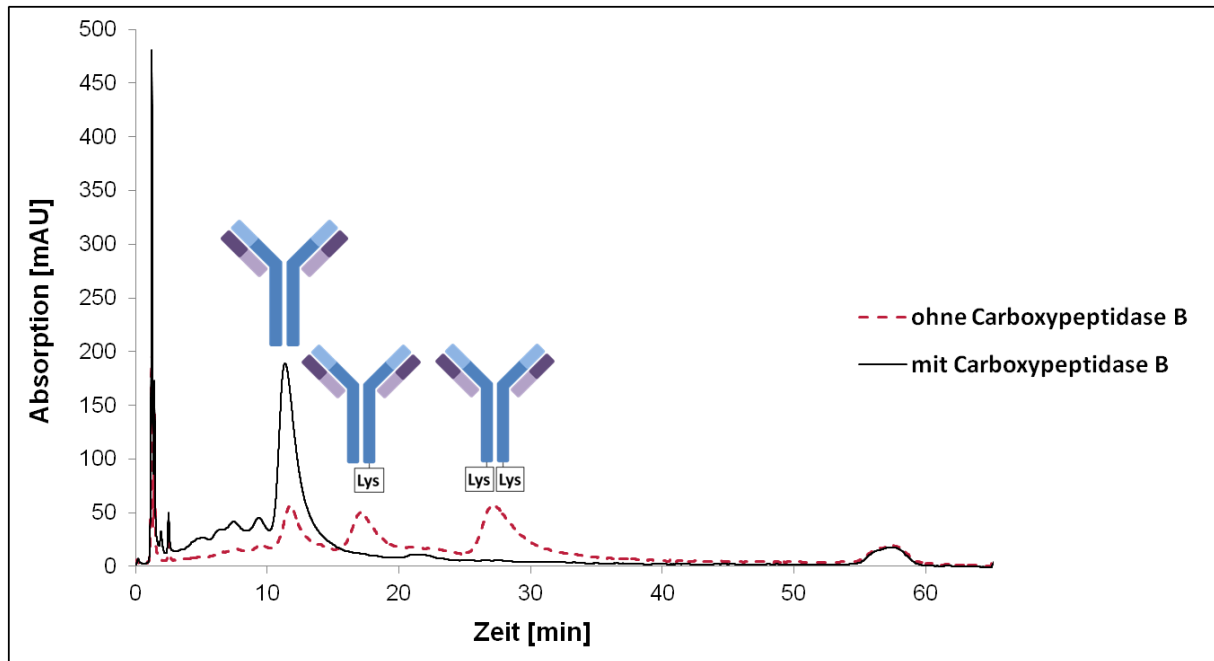
Messungen in Phosphatpuffer und in Abb. 3-38 für die Messungen mit MES-Puffer dargestellt.

Dabei zeigten sich in beiden Puffersystemen vergleichbare Ergebnisse. Das rote gestrichelte Chromatogramm ist jeweils die Messung der Blindprobe ohne Enzymzugabe, bei dem wie auch schon in den Versuchen zuvor (vgl. Abschnitt 3.3.5.1 und 3.3.5.2) jeweils drei Hauptpeaks erkennbar sind. Das schwarze Chromatogramm wurde jeweils bei Messung der Probe mit Carboxypeptidase B-Zugabe erhalten. Dieses enthält neben der Totzeit jeweils nur noch den ersten Hauptpeak in beiden Puffersystemen bei etwa 12 min. Die beiden hinteren Hauptpeaks treten nach der Enzymzugabe nicht mehr auf.



**Abb. 3-37** Beispielchromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit WCX in Phosphatpuffer pH 6,0 ohne Zusatz als Blindprobe (rote gestrichelte Linie) mit den typischen drei Hauptpeaks und nach Zusatz des Enzyms Carboxypeptidase B (schwarze durchgängige Linie) mit nur noch einem Hauptpeak, jedoch mit deutlicher Zunahme der Peakfläche und den schematisch zugeordneten Formen des monoklonalen Antikörpers mit unterschiedlichen Lysinresten; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.5

Die mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist in den beiden Abbildungen 3-37 und 3-38 gleich mit präsentiert. Wie in der Literatur beschrieben [223,244,248,249] konnten auch bei dem hier vorliegenden monoklonalen Antikörper verschiedene Formen mit unterschiedlichen C-terminalen Lysinresten separiert werden. Ein Lysinrest hat eine Masse von 128 Da und erhöht die Ladung des Antikörpers um +1, was die Ladungsheterogenität der einzelnen Formen des Antikörpers ausmacht [244]. Diese Ladungsunterschiede der einzelnen Antikörperformen ermöglichen eine Trennung mit dem schwachen Kationenaustauscher, sodass bei den Analysen ohne Zugabe von Carboxypeptidase B der erste Hauptpeak dem Antikörper ohne Lysinrest entspricht, der zweite Peak dem mit einem C-terminalen Lysinrest und der Dritte dem Antikörper mit zwei Lysinresten, wie durch die schematischen Antikörper mit oder ohne Lysinresten in den Abbildungen dargestellt.



**Abb. 3-38** Analog zu Abb. 3-37 ist hier ein Beispielchromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit WCX in MES-Puffer pH 5,5 dargestellt; ohne Enzymzusatz als Blindprobe (rote gestrichelte Linie) und nach Zusatz des Enzyms Carboxypeptidase B (schwarze durchgängige Linie) mit nur noch einem Hauptpeak und den schematisch zugeordneten Formen des monoklonalen Antikörpers mit unterschiedlichen Lysinresten; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.5

Dadurch, dass das eingesetzte Enzym über die Funktion verfügt C-terminale Lysinreste abzuspalten, wurde nach dessen Zugabe nur noch der erste Peak des Antikörpers ohne Lysinreste erhalten. Da dann alle Formen des Antikörpers, welche sich nun nicht mehr durch unterschiedliche Lysinreste unterscheiden, gemeinsam eluieren nimmt die Peakfläche des ersten Hauptpeaks deutlich erkennbar in den Chromatogrammen zu, was eine weitere Bestätigung für diese Interpretation ist.

Die Theorie, dass es sich bei den drei Peaks der Antikörperprobe um unterschiedliche Formen des Antikörpers mit verschiedener Anzahl an C-terminalen Lysinresten handelt, konnte also durch die Zugabe von Carboxypeptidase B bestätigt werden, obwohl nicht im optimalen pH-Bereich des Enzyms gearbeitet wurde. Auf diese Weise konnte auch bewiesen werden, dass die entwickelten Trennmethode trotz Enzymzusatz funktionieren.

### 3.3.5.5 Relevanz der Heterogenität von Antikörpern

Bei monoklonalen Antikörpern handelt es sich, wie schon zuvor beschrieben, um sehr potente Arzneimittel, die häufig bei schweren Erkrankungen wie Krebs oder auch Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden [19–21]. Neben ihrer Neigung Aggregate zu bilden, die nach der Injektion zu starken Nebenwirkungen wie anaphylaktischen Schocks führen können [24], können auch während allen Stufen des Herstellungsprozesses (vgl. Abschnitt 2.3.3.1) Modifikationen des Endproduktes auftreten. Dieses ist bedingt durch die Herstellung in lebendigen Zellen, weshalb nicht nur das Produkt, sondern auch das Herstellungsverfahren die Anforderungen der entsprechenden Arzneibuchmonographie [22] erfüllen müssen [115]. Da diese sowohl die Stabilität als auch die Aktivität des Endproduktes beeinflussen können [244,254] ist es wichtig, diese Modifikationen zu erkennen und auch analysieren zu können. Hierfür werden neben der häufig verwendeten Kationenaustauschchromatographie auch weitere HPLC-Trennmodi wie die

Größenausschlusschromatographie, die RP-Chromatographie oder auch die Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Auch elektrophoretische Techniken wie die Isoelektrische Fokussierung (IEF), die Kapillarisoelektrische Fokussierung oder die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) kommen zum Einsatz [255].

Das vorliegende Beispiel (vgl. Abschnitt 3.3.5.3 und 3.3.5.4) ist dabei nur die „Spitze des Eisberges“, da bei monoklonalen Antikörpern sehr viele unterschiedliche Modifikationen auftreten können, sodass die Heterogenität von monoklonalen und rekombinanten monoklonalen Antikörpern von Liu et. al [255] als üblich bezeichnet wird. Hierbei kann Ladungs- und Größenheterogenität unterschieden werden. Die verschiedenen Modifikationen wurden wiederum von Liu et. al in chemische Modifikationen wie unterschiedliche Oligosaccharidreste, Disulfidbrücken, Oxidation oder auch unterschiedliche C-terminale Lysinreste - um nur eine Auswahl zu nennen - nichtkovalente Interaktionen, Konformationsunterschiede und Aggregation gegliedert. Wichtig sei hierbei auch, dass man bedenke, dass die Heterogenität nicht nur während des Herstellungsprozess auftreten könne, sondern auch durch die Probenvorbereitung während der Charakterisierung bedingt sein kann, weshalb bei Untersuchungen von mAbs parallele Kontrollen sehr wichtig seien. Da sich die monoklonalen Antikörper auf so viele verschiedene Arten unterscheiden können ist deren Charakterisierung sehr anspruchsvoll und eine große Herausforderung, die jedoch eingegangen werden muss um sichere und wirksame Moleküle produzieren zu können [255].

Ein weiterer Aspekt, den man neben den potentiellen Stabilitäts- und Wirksamkeitsaspekten beachten sollte ist, dass heterogene Formen von mAbs bei der Herstellung die Reinigungs- und Isolierungsschritte behindern, welche zum Erreichen hoher Ausbeuten nötig sind [256]. Deshalb ist es nicht nur wichtig die Heterogenität von mAbs untersuchen zu können, sondern diese auch, soweit möglich, bei den Herstellungsprozessen zu minimieren.

#### **3.3.5.6 Präzision der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers**

Obwohl die drei Hauptpeaks der Antikörpertrennung nicht basisliniengetrennt werden konnten, wurden Präzisionsmessungen der unterschiedlichen entwickelten Methoden durchgeführt. Bei diesen wurden Wiederholpräzision und Tag-zu-Tag Standardabweichung der Retentionszeiten und auch der Gesamtfläche ermittelt (siehe Tab. 3-14 bis 3-17).

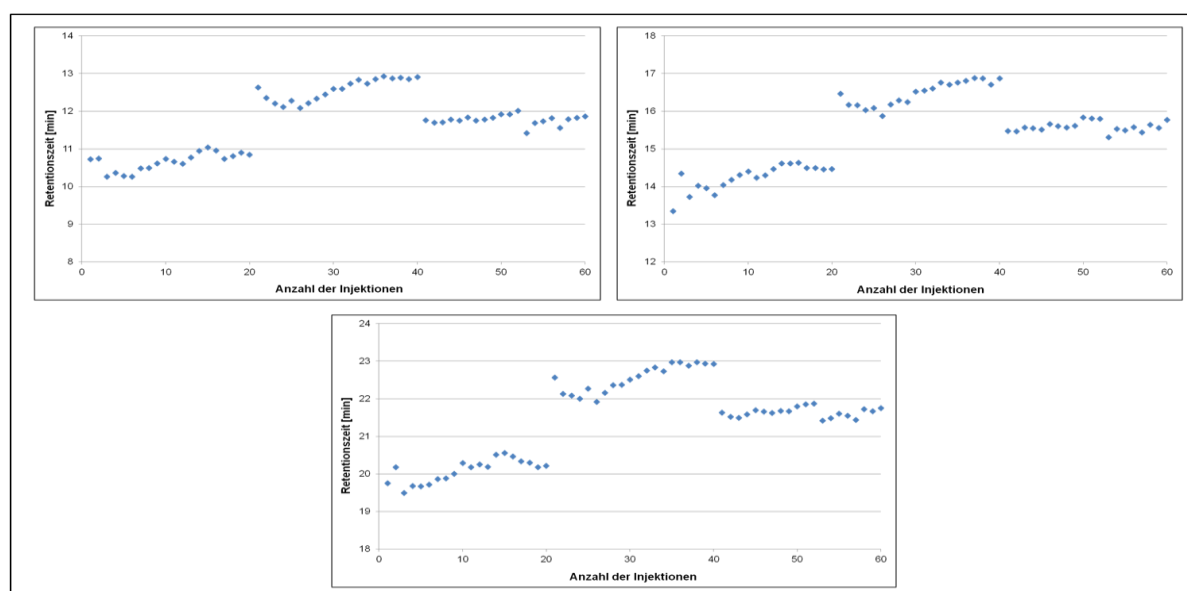
Auffällig ist bei allen Methoden, dass die Präzision der Retentionszeiten mit über einem Prozent relativ hoch sind im Vergleich zu der Größenausschlusschromatographie des monoklonalen Antikörpers mit Retentionszeiten deutlich unter einem Prozent (vgl. Tab 3-11). Allerdings wurden auch schon bei den Proteintrennungen schlechtere Standardabweichungen der Retentionszeiten in den beiden Ionenaustauschmodi (SAX und WCX) beobachtet, als dieses in Größenausschlusschromatographie und RP-Chromatographie der Fall war.

**Tab. 3-14** Präzisionsdaten der Retentionszeiten und der Gesamtfläche der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,0; Gradient 7-10 % B mit einer Flussrate von 1 ml/min; siehe Abb. 3-26

	Wiederholpräzision <sub>pooled</sub> (RSD% n=20)	Tag-zu-Tag Präzision (RSD% n=60)
<b>t<sub>R</sub> mAb ohne Lysin</b>	1,96	7,05
<b>t<sub>R</sub> mAb + 1 Lysin</b>	1,85	6,26
<b>t<sub>R</sub> mAb + 2 Lysin</b>	1,33	4,96
<b>Gesamtfläche</b>	2,63	4,60

Eine weitere Besonderheit ist der auffallend große Unterschied zwischen der Tag-zu-Tag Präzision und den einzelnen Werten der Wiederholpräzision bei allen Retentionszeiten. Bei den anderen Methoden waren sowohl bei der Proteinanalyse als auch bei der Antikörperanalyse mit der Größenausschlusschromatographie hierbei deutlich geringere Unterschiede festzustellen (vgl. Tab. 3-1, 3-11 und 3-12).

Bei genauer Betrachtung der Kontrollkarten der Retentionszeiten der einzelnen Peaks (Abb. 3-39) kann man erkennen, dass bei allen drei betrachteten Peaks etwa die gleichen Schwankungen auftraten. Sowohl während der zwanzig durchgeführten Läufe innerhalb eines Tages, als auch zwischen den drei aufeinanderfolgenden Messtagen traten die entsprechenden Schwankungen auf. So ist bei allen drei Peaks eine ungefähre Zunahme der Retentionszeit von Tag eins zu Tag zwei von etwa zwei Minuten erkennbar und eine Abnahme zum dritten Tag um etwa eine Minute feststellbar.



**Abb. 3-39** Kontrollkarten der Tag-zu-Tag Präzision (60 Läufe insgesamt an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 20 Läufen); oben links: mAb ohne Lysinrest, oben rechts: mAb mit einem Lysinrest, unten: mAb mit zwei Lysinresten



Dieses gab den Hinweis, dass eine interne Standardisierung, welche den Einfluss äußerer Faktoren minimiert, in diesem Fall sinnvoll und erfolgsversprechend sein könnte. Hierfür wird üblicherweise eine zusätzliche Substanz als interner Standard zugesetzt, die der zu analysierenden Substanz möglichst ähnlich ist, die eigentliche Trennung aber nicht stört. Dieses Verfahren wird fast immer in der Gaschromatographie verwendet [257], findet aber auch in HPLC [258] und häufig in der Kapillarelektrophorese [259] Anwendung. Dieses wird üblicherweise zur Quantifizierung verwendet um Injektionsfehler ausschließen zu können. Da bei der Vermessung des Antikörpers zunächst einmal die Retentionszeiten betrachtet wurden (vgl. Abb. 3-39), wurde statt weitere Messungen mit einem zugesetzten internen Standard durchzuführen eine Normierung über die Retentionszeit des ersten auftretenden Hauptpeaks des Antikörpers ohne Lysinrest durchgeführt und die weiteren Ergebnisse darauf bezogen. Hierfür wurden die Retentionszeiten des jeweiligen Laufes der Peaks mit einem Lysinrest oder zwei Lysinresten durch die Retentionszeit des als Standards angenommenen Peaks (mAb ohne Lysinrest) dividiert. Die Ergebnisse sind dargestellt in Tab. 3-15, was verdeutlicht, dass äußere Einflüsse noch einen gewissen Einfluss auf die Methode haben müssen, welche durch diese Vorgehensweise minimiert werden konnten. Die durch diese Methode erhaltenen Präzisionsdaten sind allerdings weiterhin noch deutlich höher als bei den SEC-Messungen des Antikörpers (vgl. Tab. 3-11).

**Tab. 3-15 Präzisionsdaten der Retentionszeiten und der Gesamtfläche der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in Phosphatpuffer pH 6,0; Gradient 7-10 % B mit einer Flussrate von 1 ml/min nach Standardisierung; siehe Abb. 3-26**

	<b>Wiederholpräzision<sub>pooled</sub> (RSD% n=20)</b>	<b>Tag-zu-Tag Präzision (RSD% n=60)</b>
<b>t<sub>R</sub> mAb ohne Lysin</b>	Standard	Standard
<b>t<sub>R</sub> mAb + 1 Lysin</b>	1,10	1,34
<b>t<sub>R</sub> mAb + 2 Lysin</b>	0,857	2,21
<b>Gesamtfläche</b>	2,63	4,60

Hierbei wurde aber deutlich, dass die Methode noch weiter optimiert werden muss, einerseits um eine bessere Trennung zu erhalten, aber auch um die Robustheit zu verbessern. Diese Optimierungsversuche finden sich in Abschnitt 3.3.5.1. Die zugehörigen Präzisionsdaten der Wiederholpräzision der vielversprechendsten Methoden sind in Tab. 3-16 und Tab. 3-17 mit und ohne Normierung präsentiert.

Dabei wird deutlich, dass die Präzision unter der Verbesserung der Selektivität (vgl. Abschnitt 3.3.5.1, Methode 1 und 2) gelitten hat. Die Präzision konnte zwar durch die oben beschriebene Normierung wiederum verbessert werden, da äußere Veränderungen keinen Einfluss mehr ausüben konnten, allerdings war die Präzision von Anfang an deutlich schlechter, als bei der zuvor beschriebenen Methode (vgl. Tab. 3-14 und 3-15), sodass hierbei nur Messungen zur Wiederholpräzision und nicht zur Tag-zu-Tag Standardabweichung durchgeführt wurden.

Tab. 3-16 Daten der Wiederholpräzision der Retentionszeiten und der Gesamtfläche der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in Phosphatpuffer pH 6,0; Gradient 7-10 % B mit einer Flussrate von 0,5 ml/min vor und nach Standardisierung; siehe Abb. 3-29

	Wiederholpräzision (RSD% n=20)	Wiederholpräzision <sub>korrigiert</sub> (RSD% n=20)
<b>t<sub>R</sub> mAb ohne Lysin</b>	9,09	Standard
<b>t<sub>R</sub> mAb + 1 Lysin</b>	8,83	0,79
<b>t<sub>R</sub> mAb + 2 Lysin</b>	13,7	4,62
<b>Gesamtfläche</b>	2,39	2,39

Tab. 3-17 Daten der Wiederholpräzision der Retentionszeiten und der Gesamtfläche der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in MES-Puffer pH 5,5; Gradient 48-58 % B mit einer Flussrate von 1 ml/min vor und nach Standardisierung; siehe Abb. 3-31

	Wiederholpräzision (RSD% n=20)	Wiederholpräzision <sub>korrigiert</sub> (RSD% n=20)
<b>t<sub>R</sub> mAb ohne Lysin</b>	13,0	Standard
<b>t<sub>R</sub> mAb + 1 Lysin</b>	15,3	2,27
<b>t<sub>R</sub> mAb + 2 Lysin</b>	17,9	4,93
<b>Gesamtfläche</b>	3,12	3,12

Aus diesem Grund wurde für den folgenden Vergleich der unterschiedlichen Trennmodi zur Analyse des monoklonalen Antikörpers (siehe Abschnitt 3.4.2) doch die zunächst präsentierte Methode (Abb. 3-26) mit den zugehörigen Präzisionsdaten (Tab. 3-14 und 3-15) verwendet.

### 3.4 Vergleich der Trennmodi und –techniken

Im Folgenden werden die entwickelten und analysierten Methoden der einzelnen Trennmechanismen zur Protein- und Antikörpertrennung zunächst untereinander verglichen. Hierbei werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufgeführt, bevor die eigentlichen Trennungen bezüglich ihrer Analysenzeit, Selektivität, Präzision und Probenvorbereitung getrennt nach Modellproteinen und Antikörper evaluiert werden. Um nicht nur die Wahl unterschiedlicher Trennmechanismen der HPLC zur Proteinanalytik einzuschränken, erfolgt abschließend ein Vergleich von Präzision, Selektivität und Praktikabilität von Proteintrennungen zwischen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und verschiedenen Elektrophoresetechniken wie der Gelelektrophorese und der Kapillarelektrophorese. Dieses soll die Auswahl einer geeigneten Trenntechnik bzw. eines Trennmechanismus vereinfachen.

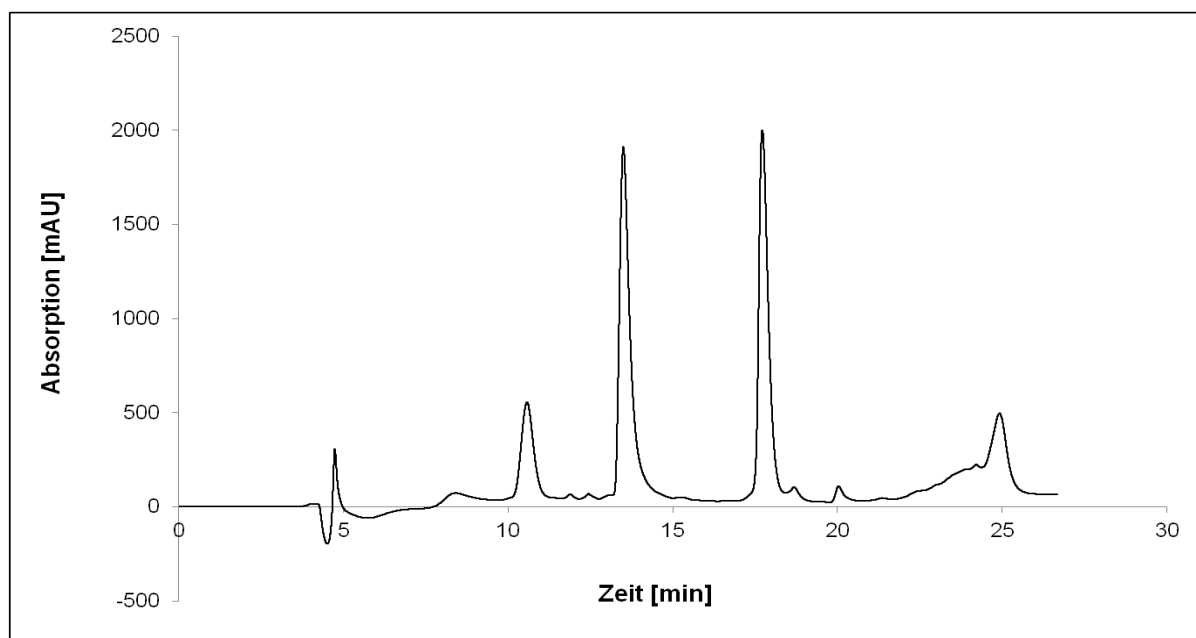
#### 3.4.1 Modellproteine

Die unterschiedlichen vorgestellten Trennmodi sollen nun bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit in der Proteinanalytik bei der Trennung der Modellproteine verglichen werden. Für die SEC wird die von Lukas Kaminski entwickelte Methode zur nicht-Idealen SEC [183] verwendet

und hierbei beide SEC-Trennsäulen in den Vergleich mit einbezogen. Für die SAX wird die entwickelte Methode zur Trennung von Myoglobin, Ovalbumin und BSA verwendet. Bei der WCX wird die Trennung von Ovalbumin, Cytochrom C und Lysozym zum Vergleich herangezogen.

Ein weiterer bisher noch nicht vorgestellter Trennmodus zur Proteintrennung wurde von Stefanie Wroblewitz im Rahmen ihrer Diplomarbeit [218] untersucht. Hierbei wurden die gleichen Modellproteine (Myoglobin, Ovalbumin und BSA) wie in den anderen Trennmodi, mit Ausnahme der WCX, verwendet, sodass ein Vergleich gut möglich ist.

Eine ausführliche Diskussion der präsentierten Ergebnisse findet sich in der zitierten Arbeit, sodass an dieser Stelle nur ein Beispielchromatogramm (Abb. 3-40) und die erreichten Präzisionsdaten (Tab. 3-18) ohne weitere Kommentierung präsentiert werden.



**Abb. 3-40** Repräsentative RP-Trennung von Myoglobin ( $t_{R1} = 17,69$  min,  $t_{R2} = 20,01$  min), Ovalbumin ( $t_{R1} = 10,55$  min,  $t_{R2} = 24,90$  min) und BSA ( $t_R = 13,49$  min) mit Säule Uptisphere® 300 Å C4, 5 µm (150 x 4,6 mm, Interchim); Flussrate: 0,5 ml/min, Eluenten: A) 5 % ACN : 95 % Wasser + 0,1 % TFA, B) 95 % ACN : 5 % Wasser + 0,1 % TFA, Gradient: linear von 85-0 % B in 26 min; Detektion: UV – 214 nm, Injektionsvolumen: 50 µl [218]

**Tab. 3-18** Präzisionsdaten der Peakflächen und Bestimmungsgrenze der RP-Messungen der Modellproteine [218]

	Wiederholpräzision Fläche <sub>pooled</sub> (RSD% n=20)	Tag-zu-Tag Präzision Fläche (RSD% n=60)	LOQ
<b>BSA</b>	1,51	1,67	<15 µg/ml
<b>Ovalbumin 1</b>	1,31	1,46	15 µg/ml
<b>Ovalbumin 2</b>	5,36	5,51	
<b>Myoglobin 1</b>	1,55	1,59	~ 10 µg/ml
<b>Myoglobin 2</b>	19,1	62,7	

#### 3.4.1.1 Gemeinsamkeiten

- **Equipment**

Alle untersuchten Methoden wurden mit dem gleichen Equipment durchgeführt. Zwar wurden verschiedene HPLC-Geräte verwendet, aber durch die Gerätequalifizierung zwischen den Versuchen war sichergestellt, dass diese alle nötigen Anforderungen erfüllen [173] und somit vergleichbare Ergebnisse liefern. Hierbei wurde besonderer Wert auf die Überprüfung des Detektors (UV- wie DAD) gelegt, bei dem immer wieder kontrolliert wurde, ob das Rauschen statisch ( $< 5 \times 10^{-5}$  AU), wie dynamisch ( $< 1 \times 10^{-3}$  AU) die Spezifikationen erfüllt. Hierdurch kann ein Einfluss des Detektors auf Nachweis- und Bestimmungsgrenze minimiert werden und es ist sichergestellt, dass die Proben dem gleichen elektronischen Rauschen und gegebenenfalls auftretendem Streulicht ausgesetzt waren.

- **Probenvorbereitung**

Alle Proteinproben waren dem gleichen Stress ausgesetzt, da sie auf die gleiche Art und Weise vorbereitet wurden, indem sie einzeln eingewogen und anschließend in dem entsprechenden Eluenten (je nach verwendetem Trennmechanismus) gelöst wurden. Zum Lösen wurde für alle unterstützend ein Ultraschallbad eingesetzt, in welches die Messkolben für etwa zehn Minuten gestellt wurden (vgl. Abschnitt 6.3.1). Vor dem Überführen in die HPLC-Vials wurden alle Proben durch Spritzenvorsatzfilter filtriert (Rotilabo®, Cellulosemischester (CME),  $0,22 \mu\text{m}$ ). Hierbei wurden allerdings für die RP-Proben Filter aus anderem Material (Rotilabo®, Polyvinylidenfluorid (PVDF),  $0,22 \mu\text{m}$ ) verwendet, da diese den verwendeten organischen Lösemitteln (Acetonitril) gegenüber beständiger sind.

- **Konzentrationsabhängigkeit**

Da bei allen durchgeführten Proteintrennungen sowohl Nachweis- als auch Bestimmungsgrenze ermittelt wurden, wurden zwischenzeitlich sehr kleine Probenkonzentrationen verwendet, um die entsprechenden Grenzen auszutesten. Hierbei konnte beobachtet werden, dass bei geringeren Konzentrationen der Probe die Präzision geringer wurde (Anstieg von RSD %). Dieser für alle Trennmodi gültige Zusammenhang zwischen Präzision und Konzentration der Probe wurde schon von Schepers et al. [260] beobachtet und beschrieben.

#### 3.4.1.2 Unterschiede

- **Selektivität**

Vergleicht man die erhaltenen Chromatogramme der unterschiedlichen Trennmodi so fällt auf, dass die Selektivität der einzelnen Methoden sehr unterschiedlich ist.

Mit Hilfe der SEC (siehe Abb. 3-12 und 3-13) konnten nur Myoglobin (17,0 kDa) und Ovalbumin (45,0 kDa) basisliniengetreunt werden. Dieses war nicht möglich unter Verwendung der „normalen“ bzw. idealen SEC, bei der die Proteine nur auf Grund ihrer molaren Massen und unter Ausschluss von Wechselwirkungen mit der Säule und untereinander getrennt werden. Zur Trennung wurde die nicht-ideale SEC herangezogen, welche diese Wechselwirkungen zulässt, sodass es, wie in diesem Fall, zu weiteren Trenneffekten kommen kann. Allerdings war auch in diesem Modus keine Basislinientrennung zwischen BSA (65,0 kDa) und Ovalbumin möglich.

In der SAX (siehe Abb. 3-4) hingegen konnten alle drei Modellproteine (Myoglobin, Ovalbumin und BSA) basisliniengetrennt werden. Hierbei war eine sehr schnelle Trennung (innerhalb von fünf Minuten) durchführbar. Diese war möglich durch die verwendete monolithische Trennsäule, welche hohe Drücke und dadurch auch hohe Flussraten zulässt.

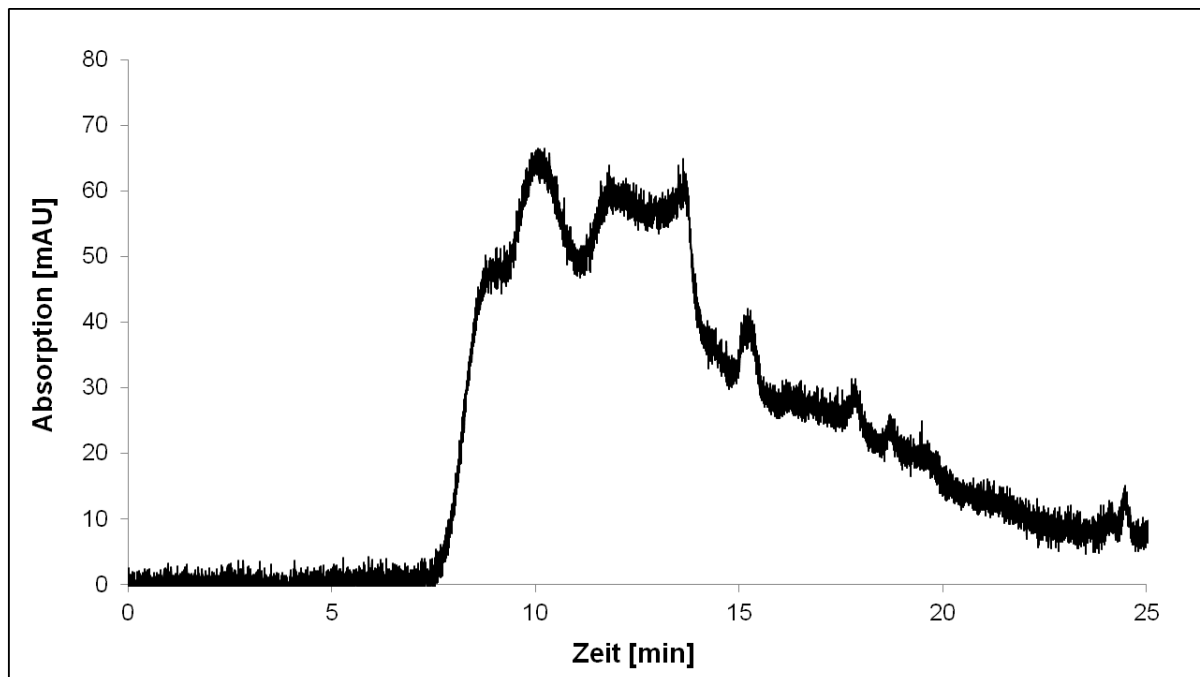
Mit höherer Selektivität konnte auch eine Basislinientrennung aller Modellproteine mit der RP-Chromatographie (siehe Abb. 3-40) erreicht werden. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass hier sowohl Myoglobin als auch Ovalbumin noch einmal aufgetrennt werden konnten, sodass sie jeweils zwei Peaks im Chromatogramm aufweisen. Bei diesem jeweiligen zweiten Peak handelt es sich wahrscheinlich um Isoformen der Proteine (siehe hierzu [218,261,262]).

Mit der WCX (siehe Abb. 3-24) war es nicht möglich Ovalbumin (pI: 4,9) und BSA (pI: 4,2-4,9) zu trennen (vgl. Abschnitt 3.3.2), da deren isoelektrische Punkte zu nah beieinander liegen. Aus diesem Grund wurden Myoglobin und BSA durch Lysozym und Cytochrom C ersetzt, da diese Proteine sehr gut trennbar waren. Dieser Aspekt wurde allerdings bei der abschließenden Bewertung (siehe Abschnitt 3.4.1.3) mit berücksichtigt.

- **Charakteristische Basislinien**

Ein weiterer Unterschied bei Betrachtung der unterschiedlichen Trennmodi sind die variierenden Basislinien bedingt durch die jeweils angewendeten Methoden und Gradienten.

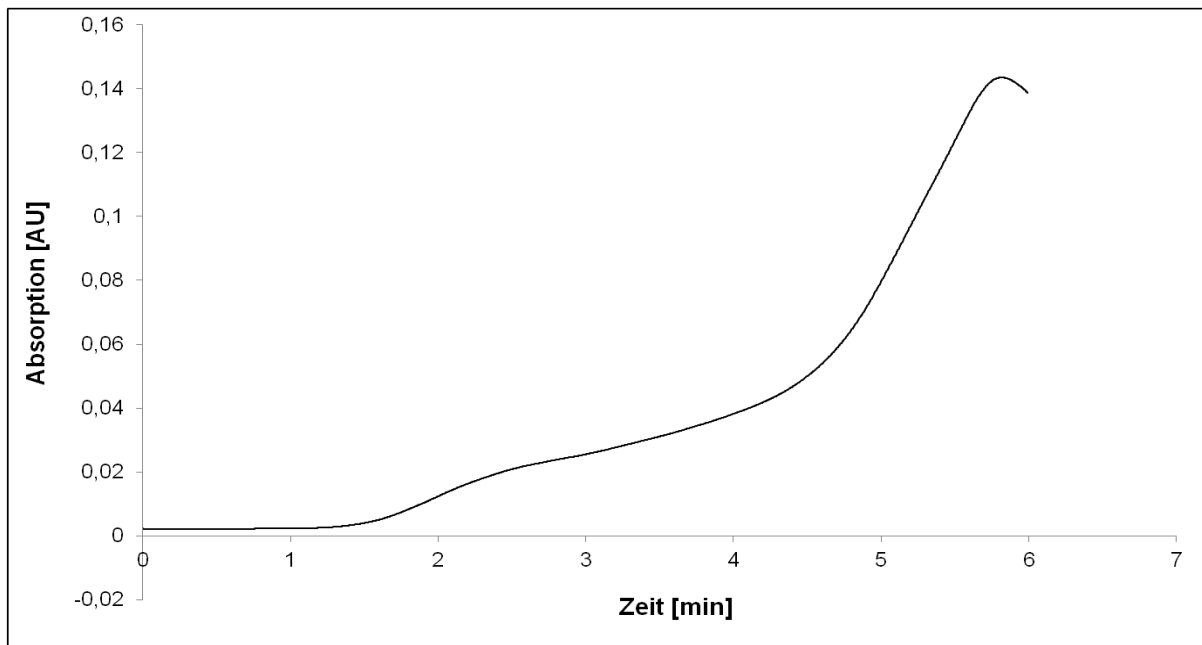
In der RP-Trennung konnte ein sogenanntes chemisches Rauschen der Basislinie (Abb. 3-41) beobachtet werden. Dieses ist bedingt durch den verwendeten Acetonitril-Gradienten und trat reproduzierbar in der dargestellten Weise auf.



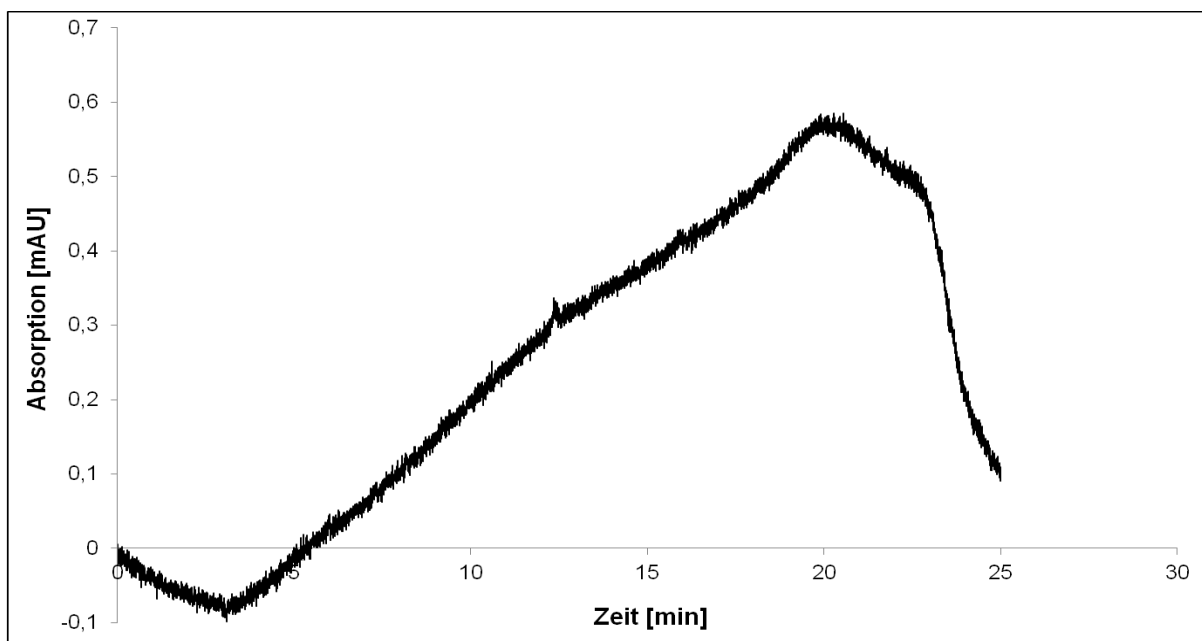
**Abb. 3-41** Blankinjektion RP mit deutlich erkennbarem chemischen Rauschen; experimentelle Bedingungen siehe Abb. 3-40 und [218]

In den beiden Ionenaustauschmodi konnte jeweils ein Anstieg der Basislinie im Laufe einer Messung beobachtet werden (siehe Abb. 3-42 und 3-43). Durch den jeweils verwendeten Salzgradienten, bei dem immer mehr des Eluenten mit höherer Ionenstärke (Eluent B) zugemischt wurde (vgl. Abschnitt 6.4.1.2 und 6.4.3.3), nahm die Absorption in jedem Lauf

gegen Ende zu und hinterher bei der Reequilibrierung zu Startkonditionen wieder ab. Dieses Phänomen wurde durch UV-spektrometrische Messungen der eingesetzten Puffersysteme überprüft, bei denen sich zeigte, dass die entsprechenden Eluenten B, denen Natriumchlorid (1 mol) zugesetzt wurde bei der Messwellenlänge von 214 nm eine deutliche höhere Absorption aufwiesen als die Eluenten A, die nur den reinen Puffer (Tris-Puffer für SAX und Phosphatpuffer für WCX) enthielten. Diese höheren gemessenen Absorptionen sind bedingt durch die steigende Chloridkonzentration während eines Laufes [193] - Prüfung auf Streulicht mit Kaliumchlorid.



**Abb. 3-42** Blankinjektion Proteintrennung SAX mit deutlichem Anstieg der Basislinie auf Grund der steigenden Chloridkonzentration durch den eingesetzten Gradienten; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2



**Abb. 3-43** Blankinjektion Proteintrennung WCX mit Anstieg der Basislinie mit anschließendem Abfall auf Grund der Reequilibrierung der Säule; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.3

### 3.4.1.3 Bewertung

Bei allen gezogenen Vergleichen und Bewertungen muss im Hinterkopf behalten werden, dass es sich um unterschiedliche Trennmechanismen handelt und beispielhaft unterschiedliche Modellproteine gewählt wurden. Jeder Trennmodus stellt jeweils andere Anforderungen an die Analyten, sodass beispielsweise die Selektivität für die SEC bei Verwendung anderer Modellproteine, welche sich in ihrer molaren Masse deutlicher unterscheiden, besser sein kann und hingegen für die beiden Ionenaustauschmodi schlechter, wenn die isoelektrischen Punkte zu dicht beieinander liegen.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Trennmodi mit den beschriebenen Methoden und den eingesetzten Modellproteinen gilt zusammenfassend Tab. 3-19. Für die SEC wurden beide Trennsäulen (PSS=Säule Proteoma 300 Å, 5 µm, PSS; Phe=Säule BioSep™ S-3000, Phenomenex) bezüglich ihrer Peakkapazität einzeln aufgeführt, da dort deutliche Unterschiede erkennbar waren (vgl. Abschnitt 3.2.2). Hierbei wurde der nicht-ideale Modus betrachtet. Obwohl die Selektivität und die Peakkapazität in engem Zusammenhang stehen und normalerweise gilt, dass die Selektivität umso besser ist, je höher die Peakkapazität, sind diese hier getrennt voneinander aufgeführt weil hier eine Besonderheit beobachtet wurde, die nicht in dieses Schema passte.

Die Werte für die Peakkapazität, die in dieser Tabelle aufgeführt sind, wurden berechnet indem jeweils die Basisbreite des schmalsten und des breitesten Peaks eines Chromatogramms betrachtet wurden und deren mögliches Auftreten bei einer Auflösung von 1,0 in zehn Minuten berechnet wurde. Hierdurch ergab sich ein Wert für den Idealfall (in der Tabelle mit „+“ gekennzeichnet) und ein Wert für den schlechtesten Fall (mit „-“ gekennzeichnet). Von der Berechnung der Methode, die den jeweiligen Gradienten berücksichtigt [263], wurde auf Grund der besseren Vergleichbarkeit abgesehen, da in diesem Fall nicht bei allen Methoden ein Gradient zum Einsatz kam. An Hand der berechneten Peakkapazität der SEC ist ersichtlich, dass diese verglichen mit den anderen Trennmodi am geringsten ist. Deshalb wurde auch die Selektivität mit einem Minus bewertet. Erkennbar ist auch, dass die Peakkapazität bei Nutzung der Säule von Phenomenex höher ist, als bei Verwendung der Säule von PSS, worauf schon die Chromatogramme beider Säulen in Abschnitt 3.2.2 hindeuteten. Die Anionenaustauschchromatographie weist eine deutlich höhere Peakkapazität auf. Die beste Peakkapazität wurde jedoch in der Kationenaustauschchromatographie erreicht, gefolgt von der RP-Chromatographie. Allerdings tritt hier die angesprochene Diskrepanz in der Bewertung der Selektivität auf. Obwohl die Peakkapazität der RP-Chromatographie geringer ist als bei der WCX, wurde die Selektivität als besser bewertet. Das liegt einerseits daran, dass es möglich war, die gewählten Modellproteine Myoglobin, Ovalbumin und BSA mit der RP-Chromatographie vollständig zu trennen, was mit der WCX nicht möglich war (vgl. Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2). Andererseits konnte das in beiden Modi verwendete Ovalbumin, welches somit direkt zum Vergleich herangezogen werden kann, im RP-Modus in zwei deutlich voneinander separierte Peaks (Retentionszeiten: 10,55 min und 24,90 min; vgl. Abschnitt 3.4.1) getrennt werden, was im WCX-Modus nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde die Selektivität, für dieses Beispiel, für die RP-Chromatographie besser bewertet als in der Kationenaustauschchromatographie.

Alle Methoden der unterschiedlichen Trennmodi verfügen über eine ausreichende Präzision, welche eine Quantifizierbarkeit der Proteine möglich macht. Allerdings war die Präzision in

SEC und RP noch etwas besser als in den beiden Ionenaustauschmodi (vgl. Tab. 3-1, 3-3 und 3-4, 3-12, 3-18).

Die kürzeste Analysenzeit konnte in der SAX erreicht werden. Dieses ist bedingt durch die monolithische Form der Säule, welche hohe Drücke und somit auch höhere Flussraten erlaubt (vgl. Abschnitt 2.1.1.5). Allerdings kommt es bei der Bewertung nicht nur auf die eigentliche Analysenzeit an, sondern auf die Zeit, die benötigt wird bis ein neuer Lauf gestartet werden kann. Deshalb reicht es an dieser Stelle nicht, nur die Analysenzeit zu betrachten. Es muss auch die nötige Zeit zur Säulenreequilibration (in Klammern hinter der Analysenzeit in der Tabelle) auf Grund von eingesetzten Gradienten mit herangezogen werden. Insgesamt gesehen konnten somit mit der SEC die kürzesten Läufe durchgeführt werden, da hier mit einer isokratischen Elution gearbeitet wurde. Bei den drei anderen Trennmodi schloss sich jeweils noch die Reequilibrationszeit an, sodass insgesamt gesehen die gleiche Zeit für einen Lauf in der SAX und WCX benötigt wurde und die Läufe in der RP-Chromatographie die längste Zeit benötigten.

Die Bestimmungsgrenze liegt bei allen Trennmechanismen in einem ähnlichen Bereich. Mit der SEC waren von Dr. Lukas Kaminski die geringsten Substanzmengen quantifizierbar ( $LOQ < 4 \mu\text{g/ml}$ ) [183].

Die Probenvorbereitung war wie in Abschnitt 3.4.1.1 beschrieben bei allen Modi identisch, sodass bei dieser Bewertung das Hauptaugenmerk auf der Herstellung der Eluenten liegt. Die einfachste Herstellung war in der SEC möglich, da hier, wie schon erwähnt, mit einer isokratischen Elution gearbeitet wurde, sodass nur ein Puffer hergestellt werden musste (vgl. Abschnitt 6.4.2.2). Bei den drei anderen verwendeten Trennmodi wurden Gradientenelutionen mit jeweils zwei Eluenten verwendet. Hierbei wurden in der RP-Chromatographie nur Acetonitril und Wasser in unterschiedlichen Verhältnissen für die Eluenten A und B gemischt [218]. Eine pH-Wert-Einstellung war nicht nötig. Bei den beiden Ionenaustauschmodi hingegen kamen jeweils zwei Puffersysteme mit anschließender pH-Wert-Einstellung zum Einsatz, sodass hier die Eluentenherstellung im Vergleich mit den anderen Methoden am aufwendigsten war (vgl. Abschnitt 6.4.1.2 und 6.4.3.3).

**Tab. 3-19 Vergleich der unterschiedlichen Trennmodi basierend auf den zuvor vorgestellten Methoden zur Proteintrennung bezüglich verschiedener Parameter der Methodenbewertung**

	Peakkapazität <sup>a)</sup> [Peaks/10 min]		Selektivität <sup>b)</sup>	Präzision <sup>b)</sup>	Analysen- zeit [min] <sup>c)</sup>	LOQ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Proben-/ Eluenten - vorberei- tung <sup>b)</sup>
	+	-					
<b>SEC</b>							
- PSS	2,22	1,67	-	++	16	< 4	+++
- Phe	6,67	5,00					
<b>SAX</b>	13,3	6,67	+	+	5 (+20)	< 15	+
<b>WCX</b>	20,0	8,33	+	+	17 (+18)	< 10	+
<b>RP</b>	16,7	5,00	+(+)	++	26 (+22)	< 15	++

<sup>a)</sup> +: schmalster Peak einer Trennung; -: breiter Peak einer Trennung

<sup>b)</sup> Bewertung von schlecht (-) bis sehr gut (+++)

<sup>c)</sup> eingeklammerte Zahlen zeigen die nötige Zeit zur Reequilibration der Säule



### 3.4.2 Monoklonaler Antikörper

Die unterschiedlichen Trennmodi sollen auch in Bezug auf ihre Leistungsfähigkeit bei der Trennung und Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers verglichen werden. Hierbei wurden die entsprechenden entwickelten Methoden zum Vergleich herangezogen.

Die bei dem Vergleich bewertete Methode mit dem schwachen Kationenaustauscher ist die in Abschnitt 3.3.5.1, Methode 1, Abb. 3-26 (mit zugehörigen experimentellen Bedingungen) präsentierte.

Allerdings ist zu beachten, dass es sich bei der Methode mit dem starken Anionenaustauscher um keine validierte Methode handelt, da noch keine Präzisionsmessungen durchgeführt wurden. Die Methode wurde in dem derzeitigen Entwicklungsstand (vgl. Abschnitt 3.1.4, Abb. 3-8) bewertet.

Die für die SEC zum Vergleich herangezogene ist in Kapitel 3.2.5 zu finden (Abb. 3-18).

Bisher existiert noch keine Methode zur RP-Trennung des verwendeten monoklonalen Antikörpers, sodass dieser Trennmodus noch nicht in den Vergleich mit eingehen kann.

#### 3.4.2.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede

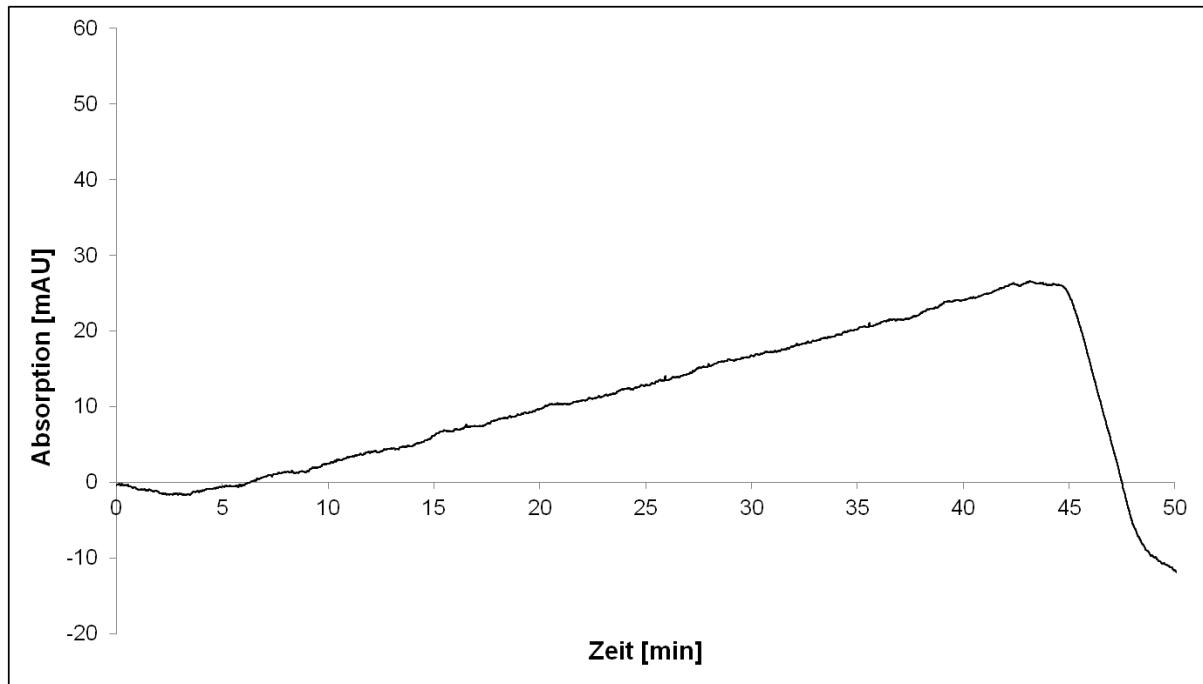
Da die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Antikörperanalysen sehr ähnlich den bei den Proteintrennungen beschriebenen sind, werden diese in diesem Abschnitt nur kurz angesprochen, da sie in Abschnitt 3.4.1.1 und 3.4.1.2 bereits ausführlich diskutiert wurden.

Auch bei den Analysen des monoklonalen Antikörpers mit den unterschiedlichen Trennmechanismen wurde das gleiche Equipment verwendet, sodass die Erläuterungen aus Abschnitt 3.4.1.1 auch hier gelten. Ebenso war die Probenvorbereitung bei den unterschiedlichen Trennmechanismen jeweils gleich mit Ausnahme des verwendeten Fließmittels zur Verdünnung bis zur entsprechenden Konzentration der Probe.

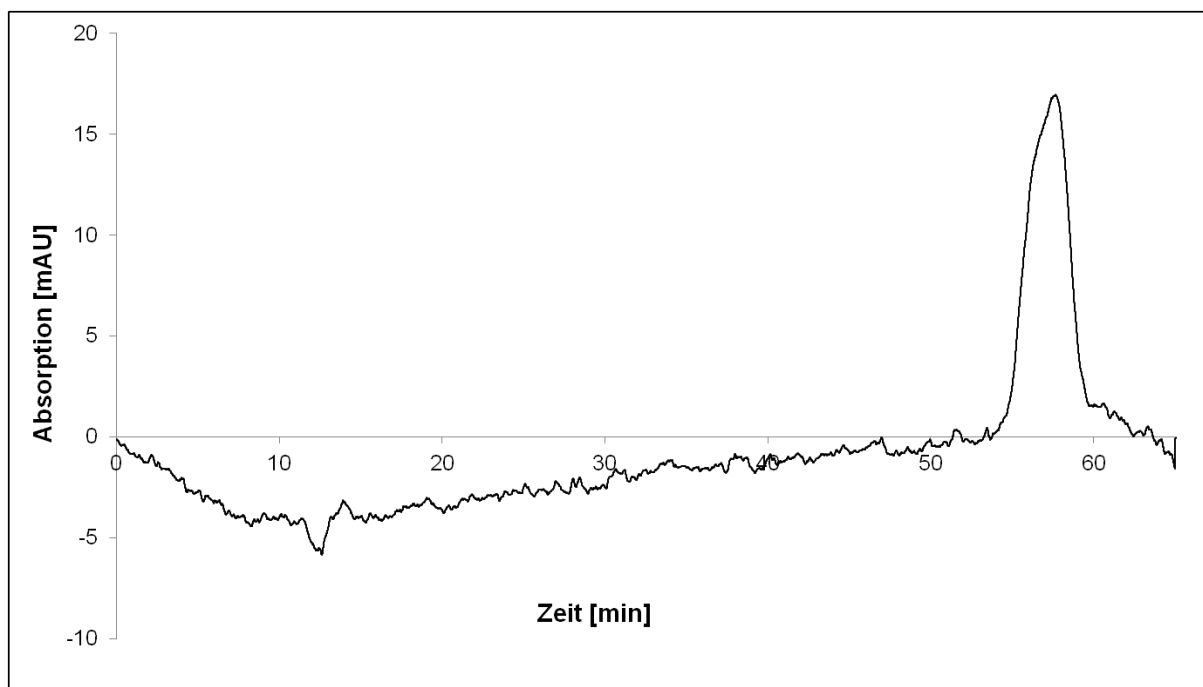
Da die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Methoden zur Antikörpertrennung nicht ermittelt wurden, ist in diesem Zusammenhang keine Aussage über die Konzentrationsabhängigkeit möglich.

Wie auch bei den Proteintrennungen mit den einzelnen Trennmechanismen ist aus den Chromatogrammen der Antikörpertrennungen die unterschiedliche Selektivität der einzelnen Modi deutlich ersichtlich (vgl. Abb. 3-8, Abb. 3-18 und Abb. 3-26 bzw. Abb. 3-31). In der SEC wird die Antikörperprobe in Monomer, Dimer und ein kleineres Fragment, sowie ein Multimer getrennt. Mit Hilfe der WCX erhält man drei deutlich voneinander getrennte Hauptpeaks und noch einige kleinere Nebenkomponten. Die Hauptpeaks unterscheiden sich dabei in der Anzahl ihrer C-terminalen Lysinreste, welche eine andere Nettoladung sowie eine andere Masse bedingen. Der Unterschied von 128 Da (vgl. Abschnitt 3.3.5.4) pro Lysinrest reicht dabei nicht für eine Trennung mit der SEC aus, wie das erhaltene Chromatogramm und die zugehörige Kalibration der Säule zeigt (vgl. Abb. 3-18 und 3-19). Bei dem derzeitigen Entwicklungsstand der SAX-Methode wurden zwei Peaks des Antikörpers erhalten. Da die Entwicklung dieser Methode allerdings noch nicht abgeschlossen ist, ist hier nicht auszuschließen, dass vielleicht noch eine weitere Auftrennung erfolgen könnte. Logisch wäre hierbei, dass auch wie in der WCX drei Hauptpeaks detektiert werden können, da es sich bei beiden Trennmechanismen um Ionenaustauschmodi handelt, welche auf Grund der unterschiedlichen Ladungen und isoelektrischen Punkte trennen.

Bei den WCX-Trennungen des Antikörpers traten sowohl bei der Methode mit Phosphatpuffer, als auch bei der Methode mit MES-Puffer interessante Basislinien auf, was sich wiederum durch Blankinjektionen klären ließ. Wie schon in Abschnitt 3.3.5.3 angesprochen ist der jeweils letzte Peak (vgl. Abb. 3-34 und Abb. 3-35 mit 3-44 und 3-45) bedingt durch den Gradienten der Methode, da an dieser Stelle von der Endzusammensetzung des Fließmittels zurück zu Startkonditionen equilibriert wird.

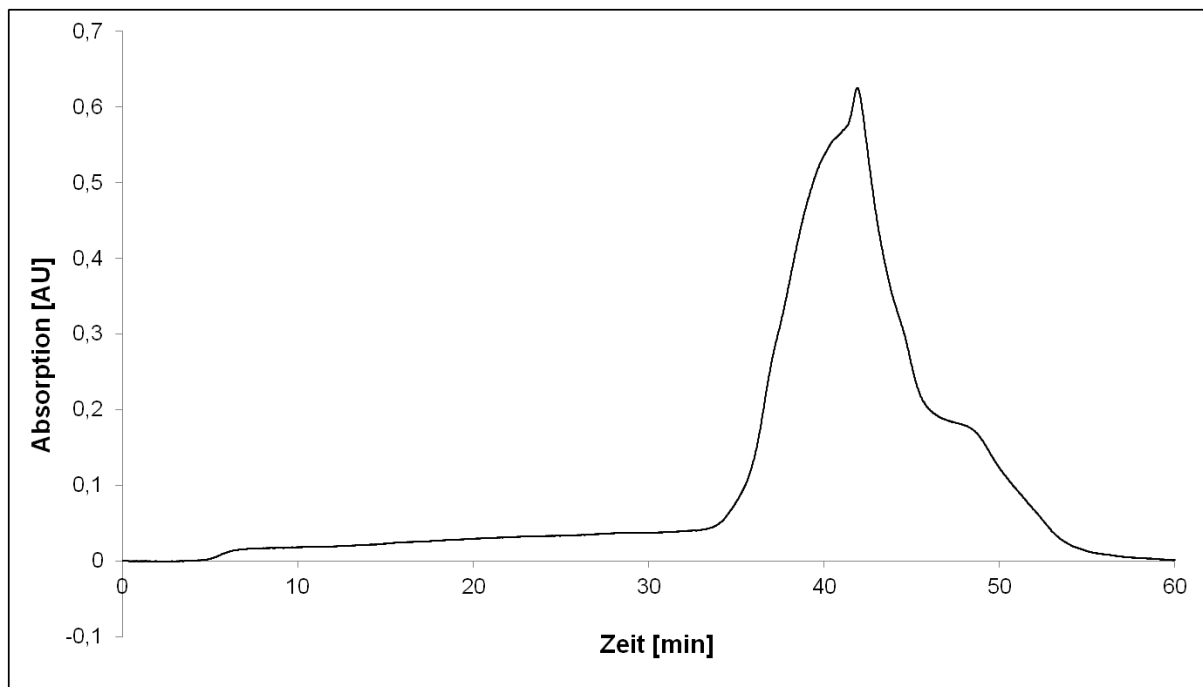


**Abb. 3-44** Blankinjektion mAb-Trennung WCX mit Phosphatpuffer, Gradient 7-10 % B; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4, Methode 1



**Abb. 3-45** Blankinjektion mAb-Trennung WCX mit MES-Puffer, Gradient 48-58 % B; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4, Methode 2

Auch bei den bisher durchgeführten mAb-Trennungen mit der SAX konnte Ähnliches beobachtet werden, da auch hier ein Gradient zum Einsatz kam (vgl. Abb. 3-8). Ein repräsentatives Chromatogramm einer Blankinjektion ist in Abb. 3-46 gezeigt.



**Abb. 3-46** Blankinjektion mAb-Trennung SAX in Tris-HCl-Puffer pH 7,0; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3

### 3.4.2.2 Bewertung

Bei der Bewertung der unterschiedlichen Trennungen des monoklonalen Antikörpers zeigt sich bezogen auf die verschiedenen Trennmechanismen ein ähnliches Bild wie auch bei den Trennungen der Modellproteine (vgl. Abschnitt 3.4.1.3).

Die höchste Peakkapazität und Selektivität konnte wiederum mit dem schwachen Kationenaustauscher erreicht werden. Nicht nur, weil hierbei relativ schmale Peaks erhalten wurden, sondern auch da es möglich war unterschiedliche Formen des Antikörpers, welche sich nur in ihren C-terminalen Lysinresten unterscheiden, zu separieren. Im Gegensatz zu den Trennungen der Modellproteine weist die Größenausschlusschromatographie bei der Trennung des monoklonalen Antikörpers eine höhere Peakkapazität als der starke Anionenaustauscher auf. Was die Aussagekraft dieses Ergebnisses allerdings ein wenig abschwächt ist, dass die SAX-Methode noch nicht den gleichen Entwicklungsstand erreicht hat wie die SEC-Methode. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass sich das Ergebnis der SAX-Methode noch durch eine Methodenoptimierung verbessern lässt.

Mit der SEC konnte erneut die höchste Präzision erreicht werden, sowohl bei der Betrachtung der Retentionszeiten als auch der Peakflächen. Bei der WCX konnte die Peakfläche nur insgesamt integriert werden, da die drei Formen des Antikörpers nicht basisliniengetrennt werden konnten – die erhaltenen Werte waren aber akzeptabel. Auch war für die Betrachtung der Präzision der Retentionszeiten eine Normierung über einen der drei Peaks nötig, sodass die auf diese Art und Weise erhaltene Präzision schon von vornherein als schlechter eingeschätzt werden muss, vor allem verglichen mit der SEC, wo dieser Schritt nicht notwendig war.

Die kürzeste Analysenzeit konnte mit jeweils zwölf Minuten in SEC und SAX erreicht werden. Allerdings muss bei den beiden Ionenaustauschmodi wieder jeweils die Zeit der Reequilibration addiert werden, sodass insgesamt gesehen wiederum mit der isokratischen Elution der SEC die kürzeste Analysenzeit erreicht werden konnte. Die Equilibrierungszeiten in den Antikörpermethoden sind etwas länger im Vergleich zu den Proteinmethoden, da sich in der Kationenaustauschchromatographie gezeigt hat, dass bei kürzerer Reequilibrationszeit noch Rückstände des Antikörpers auf der Säule verbleiben, die dann in der jeweils nächsten Analyse gefunden wurden. Dieses zeigte sich bei der Betrachtung der zugehörigen Kontrollkarte während der Methodenentwicklung und konnte durch Verlängerung der Spülzeit vermieden werden. Da die Antikörpermethode der SAX noch nicht vollständig entwickelt ist, besteht hier wahrscheinlich noch die Möglichkeit, die doch recht lange Reequilibrationszeit zu kürzen.

Bei der Proben- und Eluentenvorbereitung zeigte sich das gleiche Bild wie auch bei den Modellproteinen, sodass der Aufwand in der SEC erneut durch nur ein nötiges Fließmittel am Geringsten war. In den beiden Ionenaustauschmodi hingegen waren auf Grund der Gradientenelution wieder zwei Puffer nötig, weshalb diese als etwas aufwendiger einzuschätzen sind.

**Tab. 3-20 Vergleich der unterschiedlichen Trennmodi basierend auf den zuvor vorgestellten Methoden zur Antikörpertrennung bezüglich der bisher getesteten Parameter der Methodenbewertung**

	<b>Peakkapazität [Peaks/10 min] <sup>a)</sup></b>		<b>Selektivität <sup>b)</sup></b>	<b>Präzision <sup>b)</sup></b>	<b>Analysen- zeit [min] <sup>c)</sup></b>	<b>Proben- /Eluenten- vorbereitung <sup>b)</sup></b>
	<b>+</b>	<b>-</b>				
<b>SEC</b>	14,5	4,85	+	+(+)	12	+++
<b>WCX</b>	20,0	2,86	+(+)	(+)*	28 (+32)	+
<b>SAX</b>	3,33	1,33	-	?	12 (+48)	+

<sup>a)</sup> +: schmalster Peak einer Trennung; -: breiter Peak einer Trennung

<sup>b)</sup> Bewertung von schlecht (-) bis sehr gut (+++)

<sup>c)</sup> eingeklammerte Zahlen zeigen die nötige Zeit zur Reequilibration der Säule

\* Normierung/Standardisierung nötig

### 3.4.3 Modellproteine und monoklonaler Antikörper

Die jeweiligen Bewertungen der Trennungen der Modellproteine und des monoklonalen Antikörpers zeigen (vgl. Abschnitt 3.4.1.3 und 3.4.2.2) ein ähnliches Bild, sodass die Reihenfolge bei der Analysenzeit beispielsweise identisch ist. Auch die Präzision ist bei der SEC bei Trennung der unterschiedlichen Proben immer höher als in den anderen Trennmodi. Bei den Spalten zu Peakkapazität und Selektivität sind allerdings kleine Variationen erkennbar, sodass die SAX beispielsweise bei der Antikörpertrennung schlechter abschneidet als die SEC, was bei Trennung der Modellproteine genau umgekehrt war. An diesem Punkt muss allerdings noch einmal erwähnt werden, dass die Antikörpermethode in der SAX noch nicht vollkommen ausgereift ist und deshalb die Möglichkeit besteht, dass sich die Rangfolge nach Methodenoptimierung noch ändern kann.

Bei den angestellten Vergleichen fällt auf, dass keine generelle Aussage getroffen werden kann, welcher Trennmechanismus standardmäßig bei der Analytik von Modellproteinen oder eines monoklonalen Antikörpers eingesetzt werden sollte. Vielmehr zeigt dieser Vergleich, dass sich der eingesetzte Trennmechanismus primär nach den Eigenschaften der

untersuchten Proteine richten muss. So wird zum Beispiel bei Proteinen, die sich in ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden, idealerweise einer der beiden Ionenaustauschmodi zum Einsatz kommen und bei solchen, die über unterschiedliche molare Massen verfügen, die Größenausschlusschromatographie. Was bei der Auswahl noch berücksichtigt werden sollte, sind die weiteren in Abschnitt 3.4.1.3 und 3.4.2.2 verglichenen Parameter, sodass um eine möglichst hohe Selektivität zu erreichen, idealerweise die Kationenaustauschchromatographie eingesetzt würde oder wenn eine hohe Präzision im Vordergrund stünde, die Größenausschlusschromatographie. Um ein Proteingemisch genauer zu analysieren, sollten wenn möglich sogar mehrere Trennmechanismen zum Einsatz kommen, da man auf diese Art und Weise zusätzliche Informationen gewinnen kann. Dabei muss aber natürlich auch der Zeitaspekt berücksichtigt werden, sodass zumeist nur eine Methode für die entsprechenden Analyten eingesetzt wird, auch wenn in der Methodenentwicklung verschiedene getestet wurden.

#### **3.4.4 HPLC vs. Elektrophorese**

Nachdem die unterschiedlichen HPLC-Trennmechanismen als selektive und präzise Möglichkeiten zur Proteintrennung präsentiert und bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit für diesen Ansatz verglichen wurden, soll im Folgenden ein Vergleich mit elektrophoretischen Trenntechniken erfolgen, da diese ebenfalls häufig für Proteintrennungen eingesetzt werden. Obwohl Ciccone [264] diesen Vergleich als wenig sinnvoll erachtet, da es sich um zwei komplett unterschiedliche Arten der Trennung handelt, ist hier ein Vergleich angestrebt, da HPLC und Elektrophorese als orthogonale Techniken häufig für ähnliche Trennprobleme eingesetzt werden. Hjertén sieht die Gemeinsamkeit der Techniken darin, dass diese die Analyten jeweils auf Grund von Unterschieden der Transportgeschwindigkeit trennen. Bedingt sind diese Geschwindigkeitsunterschiede in der Elektrophorese durch das elektrische Feld und in der HPLC durch den Fluss als hydrodynamische Kraft [265].

Die Ungenauigkeit (engl.: imprecision) einer Kapillarzonenoelektrophorese (engl.: capillary zone electrophoresis, CZE) zur Serumproteinanalyse, ausgedrückt in Variationskoeffizienten, wurde von Luraschi et al. [266] untersucht und von Bossuyt [267] diskutiert. Hierbei wurden bei Bestimmungen zur Langzeitpräzision von 205 Analysen über ein Jahr relative Standardabweichungen von 1,2 % für Albumin und 3,2-6,1 % für die anderen Proteinfractionen erreicht. Die Präzision der kapillarisoelektrischen Fokussierung (engl.: capillary isoelectric focusing, CIEF) für Proteintrennungen wurde von Suratman et al. untersucht [268,269]. Für längere Serien konnten in diesem Trennmodus für die Peakflächen relative Standardabweichungen zwischen 5,09 und 8,73 % erreicht werden. Für die Mobilitäten, welche den Retentionszeiten in der HPLC gleichzusetzen sind, wurden Werte bis 1,15 % ermittelt. Dieses ist sowohl für die Peakflächen als auch für die Mobilitäten der HPLC deutlich unterlegen. Die Präzision der zur Proteinanalyse standardmäßig eingesetzten SDS-PAGE konnte zwar im Vergleich zu den früher postulierten Präzisionswerten von bis zu 33 % [270] in den letzten Jahren deutlich verbessert werden [29,174,271,272], allerdings konnte die Tag-zu-Tag Präzision der unterschiedlichen HPLC-Trennmechanismen hierbei nicht erreicht werden. Weitere negative Aspekte dieser Technik sind die aufwendige Vorbereitung der Trenngele und nötigen Lösungen, was sehr viel Zeit in Anspruch nimmt. Weiterhin wurde von Schröder und Deng evaluiert, dass die guten Präzisionswerte nur von geschultem und geübten Personal erreichbar sind [273,274]. Eine inzwischen immer häufiger eingesetzte Alternative zur SDS-PAGE stellt die Kapillargelelektrophorese (engl.: capillary gel electrophoresis, CGE) dar. Diese kann ebenso wie die Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine

genutzt werden. Die Wiederholpräzision hierfür wurde von Cianciulli et al. zwischen einem und zwei Prozent relativer Standardabweichung für die Peakflächen ermittelt [275]. Allerdings wird hierfür eine Normierung über die Gesamtpeakfläche angewendet, was in der HPLC nicht nötig ist.

Die Selektivität von kapillarelektrophoretischen und HPLC-basierten Techniken ist meist vergleichbar. Es gibt nahezu keine Anwendung, bei der eine der Techniken eingesetzt werden kann und die andere nicht. Es muss allerdings nach dem Aufwand bei der Methodenentwicklung entschieden werden. Die „ideale Technik“ muss entsprechend der Proteineigenschaften und dem erwarteten Ziel ausgewählt werden, wie dies auch schon in Abschnitt 3.4.3 für die unterschiedlichen HPLC-Trennmechanismen angesprochen wurde. In einigen Fällen sind die kapillarelektrophoretischen Techniken bezüglich der Peakkapazität überlegen (z.B. die Analyse des monoklonalen Antikörpers mit der CGE [275] verglichen mit der HP-SEC-Analyse) und in Anderen die Chromatographischen. Die höchste Selektivität weist zweifelsohne die 2-dimensionale Gelelektrophorese auf.

Die Signal-Rausch-Verhältnisse von CE-Methoden sind üblicherweise schlechter als in vergleichbaren HPLC-Methoden [224]. Dieses ist bedingt durch die nicht ganz einfache Detektion und den kurzen Lichtweg in der CE verglichen mit der HPLC. Dementsprechend sind mit der HPLC normalerweise geringere Proteinkonzentrationen quantifizierbar, also eine bessere Bestimmungsgrenze erreichbar.

Ein Vergleich der unterschiedlichen Analysenzeiten von Elektrophorese und HPLC stellt sich sehr schwierig dar. Schon bei dem Vergleich der Analysenzeiten der unterschiedlichen HPLC-Trennmechanismen (vgl. Abschnitt 3.4.1.3 und 3.4.2.2) ließen sich große Unterschiede feststellen. Genauso ist es bei dem Vergleich von HPLC und Elektrophorese. Es lässt sich klar sagen, dass die Gelelektrophorese eine deutlich längere Analysenzeit mit anschließender Färbung benötigt [274]. Vergleicht man allerdings HPLC und CE ist solch eine Aussage nicht so eindeutig zu treffen, da in beiden Techniken sowohl sehr schnelle Methoden zur Proteinanalyse existieren [276,277] als auch häufig längere Analysenzeiten nötig sind. So sind Methoden, die 30 oder 60 Minuten benötigen keine Seltenheit, bedingt durch beispielsweise die kompliziertere Trennung der Analyten. Hierbei spielen meist auch nötige Reequilibrierungszeiten in der HPLC nach Gradientenmethoden (vgl. Abschnitt 3.4.1.3 und 3.4.2.2) oder notwendige Spülungen in der CE eine Rolle [278]. Diese sollten für eine ehrliche Einschätzung der Gesamtzeit zur Nettoanalysenzeit addiert werden.

Sind für die SDS-PAGE Analyse viele vorbereitende Schritte wie beispielsweise die Gelherstellung und –färbung nötig, was aufwendig ist und viel Zeit erfordert [174], so sind Probenvorbereitung und die Vorbereitung der nötigen Puffer in HPLC und CE relativ einfach. Allerdings werden für die CE-Analysen neben der Probenvorbereitung einige Spüllösungen benötigt, um Proteinadsorption an der Kapillare zu verhindern [268,275,279]. Diese müssen vor den Analysen hergestellt oder käuflich erworben und einzeln von Hand filtriert werden. Dieses ist für HPLC-Analysen üblicherweise nicht nötig, da hier die Herstellung der mobilen Phase ausreicht, mit der die Trennsäule gespült wird. Die Filtration dieser erfolgt automatisch über Fritten im Aufbewahrungsgefäß.

Die vorgestellten Punkte zeigen, dass eine allgemeine Aussage ob elektrophoretische Techniken oder die HPLC für die Proteinanalyse zu bevorzugen ist, nicht so einfach getroffen werden kann. Neben vielen Parametern, wo die Techniken gleichauf liegen, hat die HPLC allerdings den Vorteil der deutlich einfacheren Kopplung mit beispielsweise der

Massenspektrometrie. Weiterhin ist die HPLC im Vergleich zur Kapillarelektrophorese in nahezu jedem Labor vertreten und wird schon seit vielen Jahren erfolgreich eingesetzt. Da aber keine Technik perfekt ist, sollte zur exakten Proteincharakterisierung eine Kombination mehrerer Techniken erfolgen, damit das Optimum an Information erhalten wird.

## 4 Präzision in der Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse

Seit der Entdeckung des Cisplatins 1965 [33] und seiner Einführung auf den Markt als Zytostatikum 1978 zur Behandlung unterschiedlicher Karzinome [280] erlangten metallbasierte Zytostatika immer größeres Interesse. Seitdem rückten mit Ruthenium, Osmium, Iridium, Rhodium und Rhenium [34] sowie Goldkomplexen [281] immer mehr Metalle in den Fokus für die Entwicklung neuer Krebstherapeutika. Da bei diesen während der Entwicklung auch das Verhalten in Krebszellen evaluiert werden muss, müssen sie auch aus biologischen Matrices nachgewiesen werden können. Darüber hinaus können sehr geringe Mengen von Metallen als Verunreinigungen im Produkt, zum Beispiel aus der Synthese in Form von Metallkatalysatoren enthalten sein, weshalb es wichtig ist über eine empfindliche und selektive Technik für deren Analytik zu verfügen. Aus diesem Grund wurde von der Kommission des Europäischen Arzneibuches der Arbeitsentwurf einer neuen Arzneibuchmonographie mit dem Namen „Metal catalysts or metal reagents: procedures (2.4.20)“ herausgegeben [35], welchem die Anforderungen an die analytischen Techniken zur Analyse von Metallreagenzien zu entnehmen sind. Hier werden die Atomabsorptions-(AAS) und die Atomemissionsspektrometrie (AES), sowie die Röntgenfluoreszenzspektrometrie (XRFS) und die Kopplung von Induktiv-gekoppeltem Plasma mit der Atomemissionsspektrometrie (ICP-AES) oder der Massenspektrometrie (ICP-MS) als mögliche Techniken genannt. Allerdings wird auch ausdrücklich die Möglichkeit offen gehalten, andere Techniken einzusetzen, was möglich ist, wenn sie die genannten Anforderungen bezüglich Systemtauglichkeit und Validierung erfüllen [35]. Dieses war der Ausgangspunkt für die Idee des Einsatzes der Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse bzw. -spektrometrie als alternative Technik für die Metallanalyse. Diese stellt mit den bereits in Kapitel 2.4 genannten Vorteilen eine Weiterentwicklung der Röntgenfluoreszenzanalyse dar.

Dieses Projekt wurde als Kooperationsprojekt mit einem Leihgerät von der Bruker Nano GmbH und unter Zusammenarbeit mit Andreas Meyer und Prof. Dr. Ingo Ott durchgeführt. Andreas Meyer beschäftigte sich im Rahmen dieses Projektes mit der Wiederfindung von Platin und Gold (gebunden oder ungebunden) aus wässrigen Lösungen und darüber hinaus wurde von ihm die Wiederfindung von Auranofin und Cisplatin aus Zellsuspensionen untersucht [282,283]. Das Hauptaugenmerk in der hier vorgestellten Arbeit wurde auf die Präzision der Messungen von goldhaltigen Analyten gelegt. Hierbei dienten die in dem Monographieentwurf genannten Anforderungen von 20 % relativer Standardabweichung für die Wiederholpräzision und 25 % für die Tag-zu-Tag Standardabweichung [35] als zu erreichende Werte. Als Analyten wurden das goldhaltige Antirheumatikum Auranofin und als Beispiel für den idealen Fall eine Goldstandardlösung eingesetzt.

### 4.1 Bestimmung von Gold in Auranofin

Obwohl es bei TXRF-Analysen keine Rolle spielen soll, ob das Element frei in wässriger Lösung oder gebunden vorliegt, da diese Technik element- und nicht molekülspezifisch ist und darüber hinaus unabhängig von Matrixeffekten gemessen werden kann [284], sollten beide Fälle überprüft werden. Als metallbasierte Substanz, welche gebundenes Gold enthält wurde Auranofin mit einer molaren Masse von 679,49 g/mol ausgewählt [285]. Hierbei handelt es sich um ein Arzneimittel zum Einsatz bei rheumatoider Arthritis. Obwohl Auranofin schon seit den späten 1970-er Jahren auf dem Markt ist, ist dessen Wirkmechanismus bis heute nicht vollständig geklärt [286]. Vermutet wird eine Wirkung über immunologische



Mechanismen und die Veränderung der lysosomalen Immunantwort [285]. Die Strukturformel von Auranofin ist in Abb. 4-1 dargestellt.

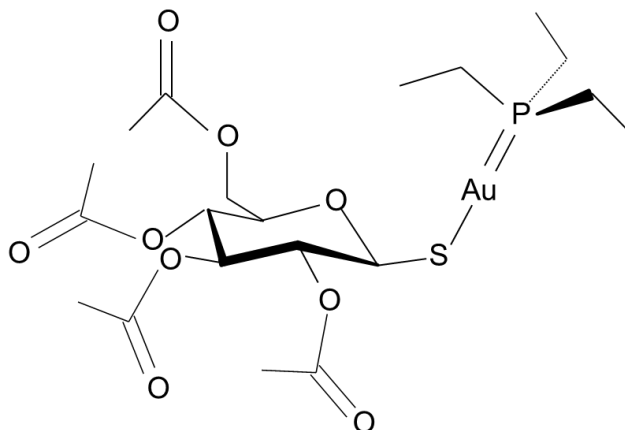


Abb. 4-1 Strukturformel Auranofin, erstellt mit Microsoft<sup>™</sup> PowerPoint<sup>®</sup> nach [287]

#### 4.1.1 Bestimmung von Wiederfindungsrate und S/N

Zur Bestandsaufnahme wurden bei den ersten Versuchen unterschiedliche Konzentrationen (0,1-10 ppm) des Auranofins vermessen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich hier und auch bei den folgenden Versuchen jeweils auf den Goldanteil des Auranofins. Die Wiederfindungsrate für Gold lag bei den höheren Konzentrationen (> 1 ppm) zwischen 70 und 90 %. Bei den niedrigeren Konzentrationen wurden auch niedrigere Wiederfindungsraten verzeichnet. Jede Probe wurde auf zwei Träger aufgebracht und es erfolgte eine Dreifachmessung der Träger, bei denen relative Standardabweichungen zwischen 0,15 % und 4,57 % für die Messung eines Trägers ermittelt wurden. Bei Berücksichtigung beider Träger wurden höhere Werte der relativen Standardabweichung erhalten. Eine direkte Beziehung zu der eingesetzten Konzentration konnte allerdings nicht festgestellt werden. Die im Rahmen dieser Vorversuche ermittelten Signal-Rausch-Verhältnisse lagen bei 100 ppb noch über 3 (=bei Betrachtung aller sechs Messungen), sodass bei dieser Konzentration die Nachweisgrenze noch nicht erreicht wurde.

Es waren folglich noch eine Menge Unklarheiten zu beseitigen. So musste zum Beispiel geklärt werden, warum die Wiederfindung nicht bei 100 % lag und worauf die doch recht hohe Variabilität beruht. Aus diesem Grund wurde das Thema im Folgenden ein wenig separiert, sodass sich Andreas Meyer, wie zuvor angesprochen, tiefergehend mit der Wiederfindungsrate beschäftigte [282,283] und sich das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf die Präzision verlagerte.

#### 4.1.2 Einfluss verschiedener Parameter auf die Präzision

Nachdem bei den ersten Versuchen zur Goldbestimmung aus Auranofin die Präzision mit unter fünf Prozent für eine Mehrfachmessung eines Trägers und höhere Werte bei Vermessung mehrerer Träger bestimmt wurde, sollten unterschiedliche mögliche Einflussparameter untersucht werden. Dabei sollte mit Hinblick auf die zu erfüllenden Präzisionsanforderungen untersucht werden, ob hier bei variierenden Parametern Unterschiede bzw. Einflüsse feststellbar sind. Die untersuchten Parameter waren (vgl. Schema des Versuchsdesigns im Anhang, Abb. 7-6):

- siliconisierte und unsiliconisierte Quarzträger
- unterschiedliche Analysenzeit (10, 100, 250, 500 und 1000 sec)
- Trocknung im Trockenofen bei 80 °C für 20 min oder bei Raumtemperatur bis zur kompletten Trocknung
- aufgetragenes Probenvolumen (4 oder 10 µl)

Darüber hinaus wurden die Träger in den Positionen 0 °, 90 °, 180 ° und 270 ° vermessen um zu evaluieren, ob die Scheibendrehung einen Einfluss auf die Analysenergebnisse hat. Einige dieser Parameter wurden schon von Mertens [288] überprüft, allerdings nicht in Hinblick auf deren Einfluss auf die Präzision der Messungen, sondern auf deren Einfluss der Bestimmung von Schwefel mit der TXRF. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tab. 4-1 dargestellt. Hierbei wird zunächst der Bereich angegeben, in dem die ermittelten Präzisionswerte bei einer Analysenzeit liegen und anschließend der daraus gepoolte Wert für die relative Standardabweichung. Aus Tab. 4-1 geht deutlich hervor, dass mit zunehmender Analysenzeit auch die Präzision zunimmt. Dieses ist erkennbar an der Abnahme der relativen Standardabweichung mit Zunahme der Analysenzeit. Dieser Aspekt wird ausführlich in Kapitel 4.1.2.1 diskutiert. Weiterhin ist aus der Tabelle erkennbar, dass die Rotation der Trägerscheiben zu keinem entscheidenden Unterschied führt (vgl. die Spalten mit Discrotation mit denen ohne Discrotation), sondern im Gegensatz zu der angestellten Vermutung sogar teilweise eine bessere Präzision mit unterschiedlichen Positionen der Trägerscheibe im Gerät erreicht werden konnte. Für keinen weiteren überprüften Parameter war ein entscheidender Einfluss feststellbar, nachdem man die Probenvorbereitung hätte optimieren können. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass alle Parameter gemeinsam zu der beobachteten Variabilität führen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass hierbei noch weitere Parameter berücksichtigt werden müssen. Trotz aller Variationen konnten bei diesen Messungen akzeptable Präzisionswerte mit deutlich unter den geforderten 20 % relativer Standardabweichung erreicht werden, was eine Eignung der TXRF für die Metallanalyse bestätigt.

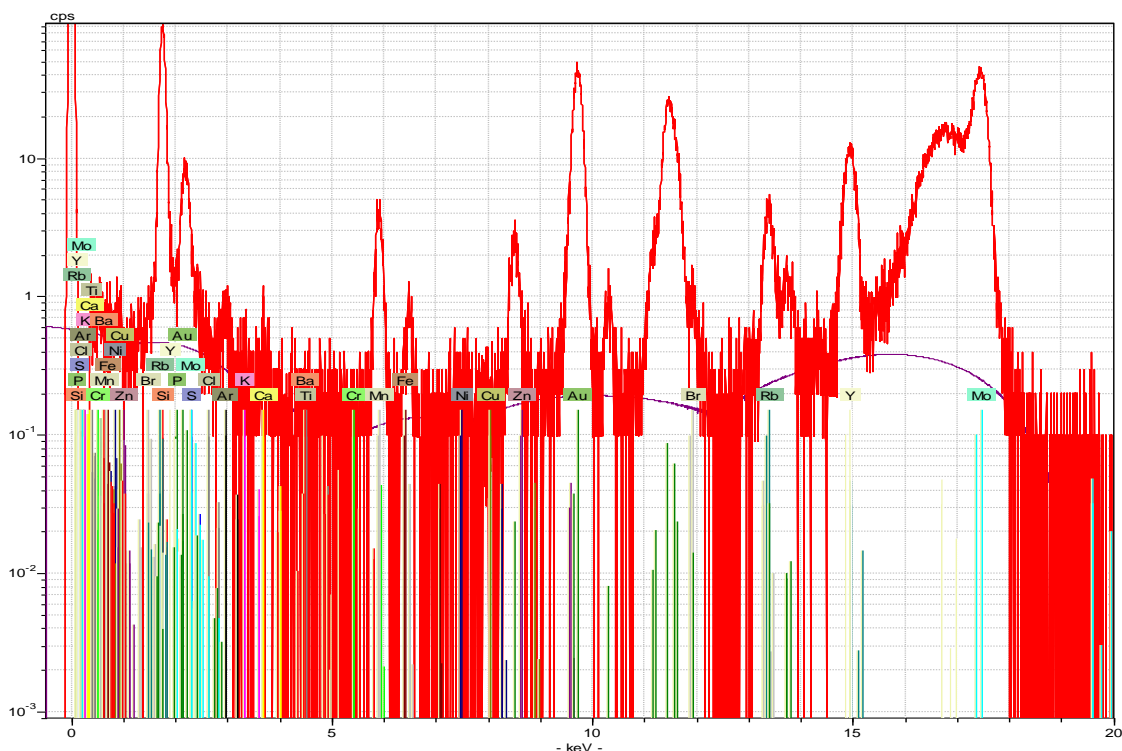
**Tab. 4-1 Präzision der Messungen von Auranofin (10 ppm Au) bei unterschiedlicher Analysenzeit und Rotation der Proben-träger im Gerät und weiterer Variationen in der Probenvorbereitung; die eingeklammerten Werte sind Einzelserien, die der Komplettheit halber erwähnt werden sollen; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.4.2**

<b>Analysen-zeit [sec]</b>	<b>Präzision [RSD %] ohne Discrotation</b>	<b>RSD %<sub>pooled</sub> ohne Rotation</b>	<b>Präzision [RSD %] mit Discrotation</b>	<b>RSD %<sub>pooled</sub> mit Rotation</b>
10	3,84-16,09 (46,72)	11,06	3,51-11,70	7,36
100	1,22-9,78	3,62	1,80-8,43	4,35
250	0,57-7,61 (47,08)	8,94	1,40-8,57	4,17
500	0,90-9,31	3,28	1,16-6,51	3,38
1000	0,41-4,68	2,92	1,00-5,22	2,75

#### 4.1.2.1 Einfluss der Analysenzeit auf S/N und Präzision

Wie schon in Kapitel 4.1.2 erwähnt, konnte von den getesteten Einflussgrößen nur ein direkter Zusammenhang zwischen der Analysenzeit und der Präzision identifiziert werden.

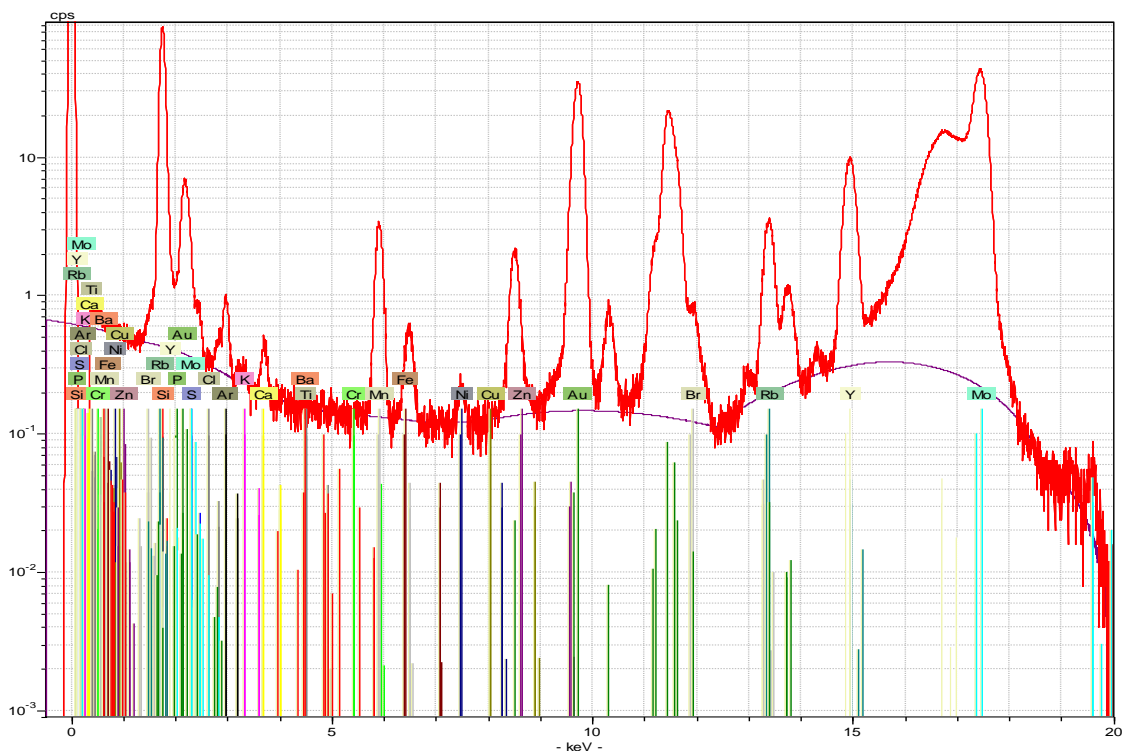
Eine Erklärung hierfür lässt sich bei Betrachtung der erhaltenen Spektren derselben Probe, welche bei unterschiedlichen Analysenzeiten vermessen wurde, leicht finden. Die folgenden Spektren (Abb. 4-2 bis 4-4) zeigen die Ergebnisse der Messung von Auranofin, mit einer Konzentration bezogen auf das darin enthaltene Gold von 10 ppm, bei unterschiedlichen Analysenzeiten. Es handelt sich hierbei um die Originalspektren aus der zugehörigen Geräte-Software Picofox. Auch wenn die Beschriftung ein wenig klein ist, sollten diese an dieser Stelle einmal präsentiert werden, da daraus mehr Informationen zu entnehmen sind, als aus den über die Rohdaten erhaltenen Spektren (vgl. Abb. 4-5 und 4-6). So ist bei den in den Abbildungen 4-2 bis 4-4 dargestellten Spektren beispielsweise schon eine Identifizierung der Elemente anhand ihrer Spektrallinien erfolgt. Diese sind im unteren Teil der Spektren in unterschiedlichen Farben unter den zugehörigen Elementenpeaks aufgeführt. Alle Spektren haben einige typische Peaks gemeinsam. So ist beispielsweise in allen der Siliciumpeak bei etwa 2,8 keV durch die verwendeten Quarzglassträger und auch der Argonpeak bei etwa 3,0 keV durch den Argonanteil der Luft enthalten [289]. Weiterhin ist in allen Spektren ein so genannter Nullenergiepeak bei 0 keV enthalten. Dieser ist durch die Elektronik und nicht durch die Probe bedingt. Durch geringe Verunreinigungen der Probenträger oder der verwendeten Chemikalien sind nahezu in allen Spektren geringe Anteile von Calcium, Zink, Eisen und Blei zu finden. Auch die zwei Peaks bei 16,5 und 17,5 keV sind typisch für ein TXRF-Spektrum. Sie sind durch die Anregung mit der Molybdän-Anode bedingt und stellen den Compton- (16,5 keV) und den Rayleigh-Streupeak (17,5 keV) dar [289]. Beide sind bedingt durch die Streuung der Anregungsstrahlung an Probenträger und Probe. Der Unterschied liegt darin, dass die Rayleigh-Streuung den Anteil der gestreuten Röntgenquanten ausdrückt, wenn sie keine Energie verlieren und die Compton-Streuung solche mit Energieverlust [289,290].



**Abb. 4-2 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 10 sec Analysenzeit; log y-Achse**

Bei den hier aufgeführten Spektren muss beachtet werden, dass es sich um eine logarithmische y-Achse handelt. Aus diesem Grund sind auch die im Folgenden berechneten

S/N-Verhältnisse geringer als sie tatsächlich sind, sodass sie wirklich nur für den Vergleich der Spektren bei unterschiedlichen Analysenzeiten mit logarithmierter Achse wie hier dargestellt, über eine Aussage verfügen. Bei den Spektren derselben Messungen mit unlogarithmierter y-Achse wurden deutlich höhere S/N-Verhältnisse ( $S/N > 100$ ) für alle Analysenzeiten ermittelt (vgl. Abb. 7-7 bis 7-9 im Anhang). Aus den Spektren mit der logarithmierten Achse ist allerdings der Unterschied deutlicher erkennbar, weshalb diese hier verwendet wurden. Vergleicht man nun Abb. 4-2 mit einer Analysenzeit von 10 sec mit Abb. 4-3 und 4-4, so fällt auf, dass das Signal-Rausch-Verhältnis mit längerer Analysenzeit verbessert wird, da das Hintergrundrauschen offensichtlich kleiner wird. Dieses ist deutlich bei der Verlängerung der Analysenzeit von 10 auf 250 sec erkennbar (vgl. Abb. 4-2 mit  $S/N=4,98$  und 4-3 mit  $S/N=7,30$ ), wohingegen der Unterschied von 250 auf 1000 sec (vgl. Abb. 4-3 mit  $S/N=7,30$  und 4-4 mit  $S/N=8,63$ ) kaum noch feststellbar ist. Deshalb wurde für die folgenden Messungen eine Analysenzeit von 250 sec verwendet, da hier ein Kompromiss zwischen kürzerer Analysenzeit, und somit einer Gesamtzeiterparnis, und einem guten Signal-Rausch-Verhältnis mit akzeptabler Präzision gefunden wurde.



**Abb. 4-3 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 250 sec Analysenzeit; log y-Achse**

Der Einfluss der Analysenzeit auf die Präzision der Messungen kann Tab. 4-1 entnommen werden. Es fällt auf, dass mit steigender Analysenzeit für die relative Standardabweichung sowohl bei den Messungen ohne Rotation des Probenträgers als auch mit Rotation kleinere Werte erhalten wurden. Anders ausgedrückt steigt also die Präzision mit zunehmender Analysenzeit. Eine mögliche Erklärung hierfür ist auch das bessere Signal-Rausch-Verhältnis mit steigender Analysenzeit, was eine bessere Quantifizierung ermöglicht [224]. Die Zunahme der Präzision ist mit Ausnahme der RSD % bei 250 ppb ohne Rotation zu bemerken. Bei diesem Wert ist allerdings auch ein sehr hoher Wert mit über 40 % relativer Standardabweichung zu berücksichtigen. Dieser wurde, auch wenn er ein Ausreißer zu sein scheint, der Komplettierung halber mit in den gepoolten Wert einbezogen, sodass dieser insgesamt relativ hoch ist.

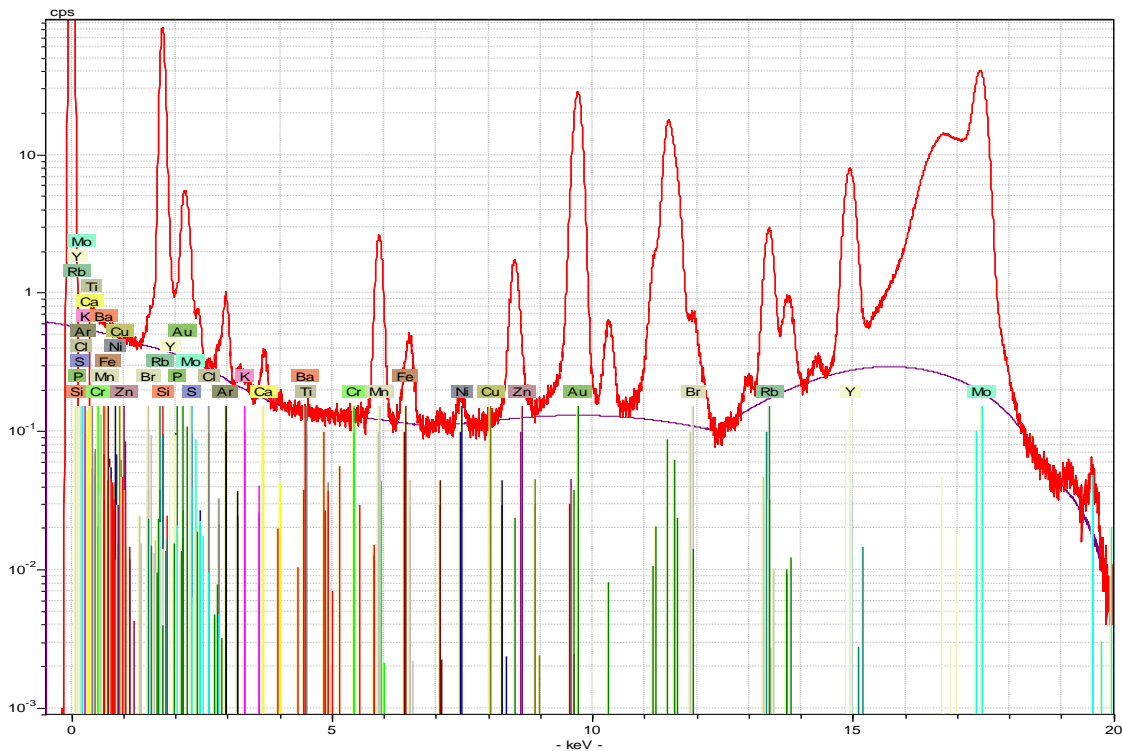


Abb. 4-4 Repräsentatives Spektrum von Aurum (10 ppm Au) mit 1000 sec Analysenzeit; log y-Achse

## 4.2 Bestimmung von Gold aus einer Gold-Standardlösung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das gebundene Gold aus Aurum bestimmbare ist und hierbei auch eine akzeptable Präzision für diese Technik erreicht werden konnte, sollte nun der „ideale Fall“ untersucht werden, um die mögliche erreichbare Präzision dieser Technik zu bestimmen. Für diesen Fall wurde kommerziell erhältliche Gold-Standardlösung eingesetzt. Im Gegensatz zu der Bestimmung des Goldes in Aurum liegt das Metall hier frei in der Lösung vor. Zwar sollte dieses für die TXRF-Messung keinen Unterschied machen, da sowohl freie als auch gebundene Elemente bestimmbar sind, aber im Fall der Gold-Standardlösung gestaltet sich die nötige Probenvorbereitung einfacher als beim Aurum. Im Gegensatz zum Aurum ist keine Einwaage, sondern nur eine Verdünnung der Standardlösung nötig, welche sich an die Einwaage des Aurums ebenfalls anschloss.

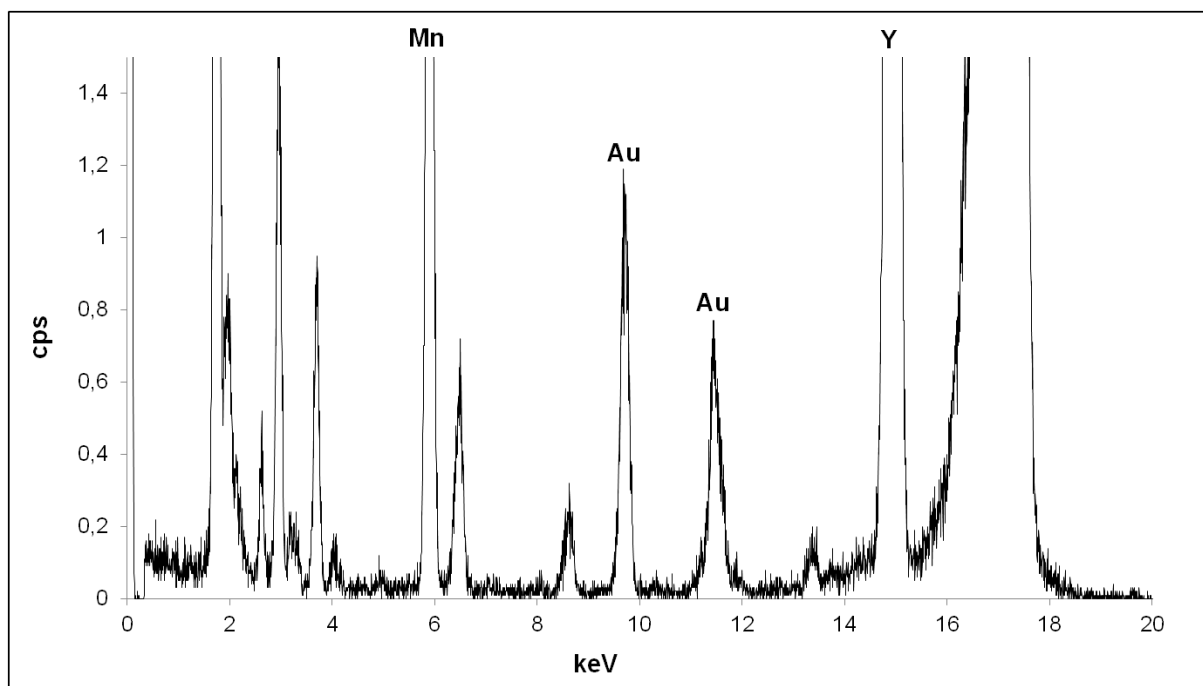
Es wurde jeweils ein Vergleich, bezüglich der Präzision und der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, von Messungen mit und ohne Zusatz von Polyvinylalkohol (PVA) angestrebt. Dieses wurde den Proben zugesetzt, da diskutiert wird, dass es beim Trocknen der Probe zu einer gleichmäßigeren Oberfläche führen soll [288,291,292], was sich dann im Rückschluss positiv auf Präzision und Wiederfindungsrate auswirken könnte. Diesem wird bei Betrachtung von Proben aus biologischen Matrices eine größere Bedeutung beigemessen als bei Betrachtung von wässrigen Proben ohne Matrixanteil. Allerdings wurden im Rahmen dieser Arbeit nur Letztere überprüft.

### 4.2.1 Vergleich Messungen mit und ohne PVA-Zugabe

Um den bestmöglichen Vergleich der Proben mit und ohne PVA zu erzielen, wurden die Proben auf die gleiche Art und Weise in derselben Konzentration vorbereitet und mit denselben Methoden vermessen. Einziger Unterschied war dabei die zugesetzte Menge an bidestilliertem Wasser, da diese bei PVA-Zugabe reduziert wurde um das gleiche

Endvolumen der Probe zu erhalten. Repräsentative Spektren der Gold-Standardlösung (250 ppb) mit einer Analysenzeit von 250 sec sind in Abb. 4-5 und 4-6 präsentiert. Wie zuvor angesprochen, wurden diese Spektren aus den Rohdaten generiert, weshalb die automatische Peakidentifizierung und die zugehörigen Spektrallinien der Peaks nicht aufgeführt sind. Für eine bessere Überschaubarkeit und weil diese Informationen für den folgenden Vergleich nicht relevant sind, wurde diese Form der Spektren gewählt.

Auf den ersten Blick erkennt man, dass in Abb. 4-6 kein Yttrium-Peak auftaucht. Dieses wurde in einigen Versuchen als zweiter interner Standard zugesetzt (wie in Abb. 4-5). Da die Quantifizierung allerdings ausschließlich über Mangan erfolgte, ist ein Vergleich dieser beiden Spektren kein Problem. Weiterhin ist erkennbar, dass die beiden Goldpeaks (L $\alpha$  und L $\beta$ ) in beiden Spektren über etwa die gleiche Höhe, ausgedrückt in der Anzahl an „counts per seconds“ verfügen und jeweils bei 9,7 keV und 11,4 keV auftauchen.



**Abb. 4-5 TXRF-Spektrum von Gold-Standardlösung (250 ppb) ohne PVA-Zusatz, L $\alpha$  Au: 9,7 keV, L $\beta$  Au: 11,4 keV; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.4.3**

Da ein Vergleich der Goldpeaks im Vordergrund stand, wurde die y-Achse, für Abb. 4-5 und 4-6 identisch so gewählt, dass die Goldpeaks möglichst deutlich erkennbar sind. Aus diesem Grund sind der Mangan- und der Yttriumpeak in diesen Abbildungen oben abgeschnitten, weil sie in einer deutlich höheren Konzentration als die Probe eingesetzt wurden (Mn: 1 ppm, Au: 250 ppb). Ein offensichtlicher Unterschied zwischen den beiden Spektren ist die Höhe des Rauschens der Basislinie. Dieser Aspekt wird ausführlich in Kapitel 4.2.1.2 diskutiert. Die Präzision der Messungen mit und ohne Zusatz von Polyvinylalkohol wird im folgenden Kapitel (4.2.1.1) genauer betrachtet.

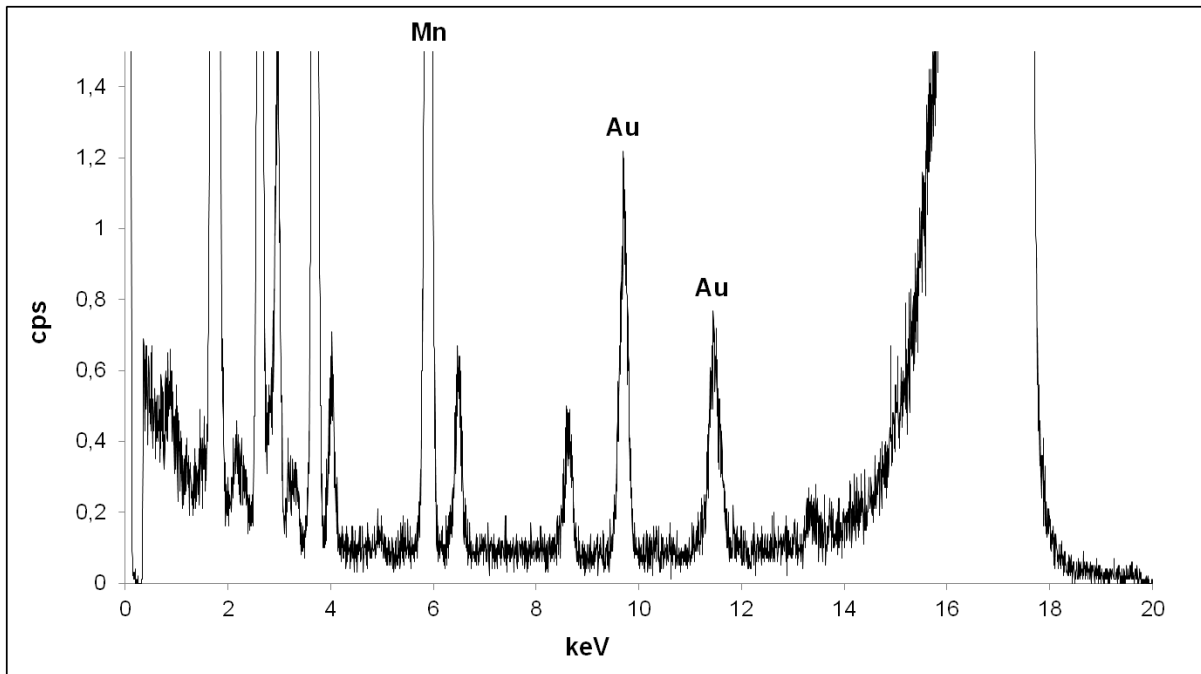


Abb. 4-6 TXRF-Spektrum von Gold-Standardlösung (250 ppb) mit 0,4 % PVA (Endkonzentration),  $L\alpha$  Au: 9,7 keV,  $L\beta$  Au: 11,4 keV; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.4.3

#### 4.2.1.1 Präzision

Bei der Überprüfung der Präzision der Methode für die Messung der Gold-Standardlösung wurden sowohl die Wiederholpräzision als auch die Tag-zu-Tag Präzision überprüft. Hierfür wurde mit einer Konzentration von 500 ppb Gold eine mittlere Konzentration gewählt. Die Präzision bei niedrigeren Konzentrationen wurde im Rahmen der Bestimmung von LOQ und LOD ermittelt (vgl. Abschnitt 4.2.1.2). Da sich bei den zuvor durchgeführten Versuchen gezeigt hat, dass bei einer Analysenzeit von 250 sec akzeptable Werte bei einem ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnis erhalten wurden (vgl. Abschnitt 4.1.2.1), weshalb dies als übliche Analysenzeit verwendet wurde, wurden auch die Präzisionsmessungen mit dieser Analysenzeit durchgeführt. Auch wenn Tab. 4-1 darauf hindeutet, dass bei längerer Analysenzeit eine bessere Präzision erreichbar ist, sollten die Präzisionsmessungen bei der üblicherweise verwendeten Analysenzeit durchgeführt werden.

Für die Messung der Wiederholpräzision wurden fünf Proben unabhängig voneinander aber auf die gleiche Weise hergestellt und jede Probe wurde auf je fünf Träger aufgebracht, sodass insgesamt 25 Probenträger präpariert wurden, welche jeweils 25-mal vermessen wurden. Dieses ist zur Verdeutlichung schematisch in Abb. 4-7 dargestellt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 4-2 zusammengefasst.

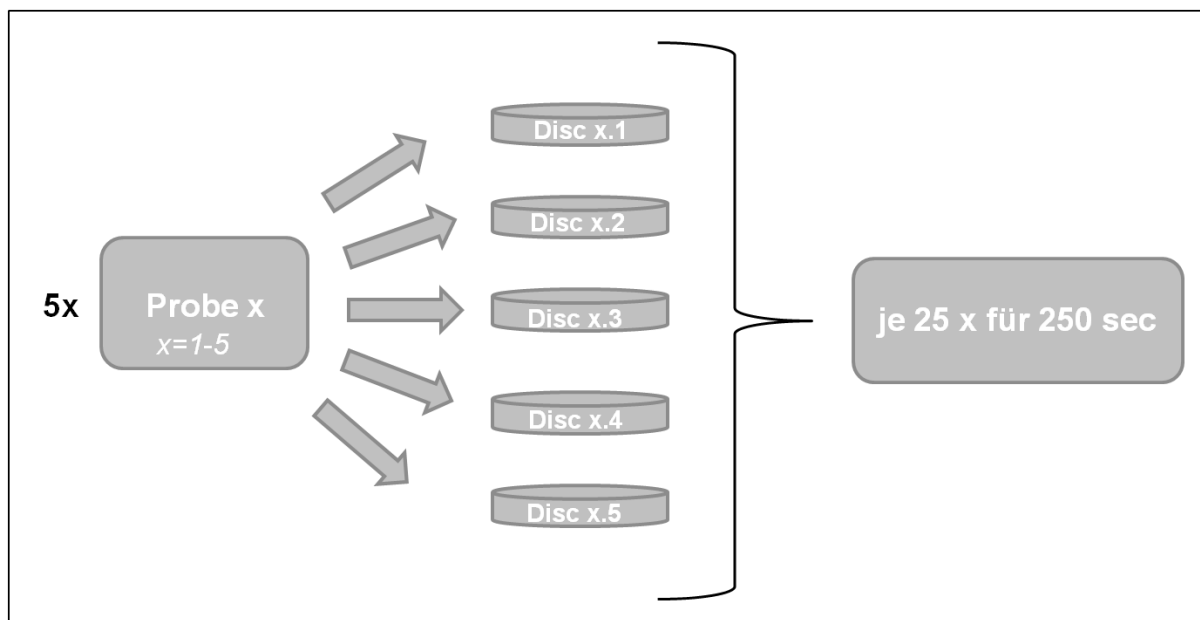


Abb. 4-7 Versuchsdesign zur Präzisionsbestimmung von Gold-Standardlösung mit und ohne PVA-Zugabe

In der letzten Spalte der Tabelle ist die Variation aller Proben und aller Messungen berücksichtigt. Obwohl es sich hierbei nicht explizit um eine Tag-zu-Tag Standardabweichung handelt und die Versuchsplanung ursprünglich nicht darauf ausgelegt war, können die Ergebnisse als solche aufgefasst werden. Grund dafür ist die insgesamt sehr lange Analysenzeit während des kompletten Versuchsdesigns. So wurden 25 Trägerscheiben jeweils 25-mal für 250 sec vermessen. Hierbei kommt man auf eine reine Gesamtanalysenzeit von 43 Stunden, zu der noch die Zeiten zum Wechsel der Scheiben in dem Gerät addiert werden müssen. Folglich wurde an zwei verschiedenen Tagen gemessen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass dabei kaum höhere Werte für die relative Standardabweichung erhalten wurden als bei der Betrachtung einer Probe (vgl. die letzten beiden Spalten). Durch den F-Test (Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ : 5,0 %, Freiheitsgrade f: 125, 625) konnte gezeigt werden, dass der Unterschied nicht signifikant ist. Bei dem F-Test handelt es sich um einen statistischen Test mit dessen Hilfe eine Aussage über die Varianzhomogenität zweier Stichproben getroffen werden kann [293]. Die Durchführung findet sich ausführlich beschrieben in [294] und soll deshalb an dieser Stelle nicht näher erläutert werden.

Tab. 4-2 Ergebnisse der Präzisionsmessungen von Gold-Standardlösung (500 ppb Au) mit und ohne PVA nach dem in Abb. 4-7 präsentierten Schema

	Präzision [RSD %] eine Disc	RSD % <sub>pooled</sub> eine Disc	Präzision [RSD %] fünf Discs	RSD % <sub>pooled</sub> fünf Discs	Präzision [RSD %] alle Proben
<b>ohne PVA</b>	1,03-2,16	1,60	6,53-10,22	8,07	8,33
<b>mit PVA</b>	1,31-2,39	1,86	1,84-14,30	7,03	7,09

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Probenvorbereitung in der TXRF-Analyse ein Fehler resultiert und somit die Präzision abnimmt. Allerdings sind zwischen den Messungen mit und ohne PVA kaum Unterschiede bezüglich der Präzision feststellbar. Für diesen Vergleich ist die Tabelle zeilenweise zu betrachten. Die Spalten mit den gepoolten relativen Standardabweichungen sind dafür besonders geeignet, da hier quasi die Mittelwerte aus der zuvor ermittelten Präzision dargestellt sind, was einen Vergleich vereinfacht. Interessant ist,



dass bei diesem Vergleich kaum ein Unterschied feststellbar ist. So wurde für die relative Standardabweichung von einem Träger (RSD %<sub>pooled</sub> eine Disc) für die Proben ohne PVA ein besserer Wert erhalten, sind mehrere Träger und Proben berücksichtigt allerdings für die Proben mit PVA. Folglich kann auf Grund dieser Daten keine Aussage getroffen werden, ob sich ein PVA-Zusatz tatsächlich positiv auf die Präzision auswirkt.

#### 4.2.1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Nachdem die Überprüfung der Präzision der TXRF-Analyse von Gold-Standardlösung abgeschlossen war, sollten die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze der verwendeten Methode ermittelt werden. Hierfür wurden, wie auch schon bei den Präzisionsmessungen, Proben mit und ohne PVA-Zusatz hergestellt. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 4-3 präsentiert. Die Analysenzeit betrug 250 sec, da sich diese als eine gute Analysenzeit herausgestellt hat, mit der auch die Präzisionsmessungen durchgeführt wurden. Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei längeren Analysenzeiten ( $\geq 500$  sec) zu besseren Signal-Rausch-Verhältnissen geführt hätten (vgl. Abschnitt 4.1.2), sodass dementsprechend auch niedrigere LOQ und LOD erreicht worden wären. Bei der Ermittlung von LOQ und LOD stand allerdings nicht im Vordergrund die absoluten Grenzen des verwendeten Gerätes zu ermitteln, sondern die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze für die zuvor auf ihre Präzision überprüfte Methode mit und ohne PVA-Zusatz für die Gold-Bestimmung zu ermitteln. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 4-3 zusammengefasst. Deutlich erkennbar ist, dass für die Proben mit PVA-Zusatz immer ein deutlich niedrigeres Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt wurde als für die Proben ohne PVA. Bei einer Konzentration von 250 ppb Gold ist das S/N bei PVA-Zugabe nur halb so groß wie ohne diesen Zusatz. Betrachtet man noch einmal Abb. 4-5 und 4-6 im Vergleich, wird auch klar warum. Bei Zugabe von PVA (Abb. 4-6) ist nicht nur das Rauschen größer, sondern auch der Ansatz der Basislinie verglichen mit dem Spektrum ohne PVA (Abb. 4-5) höher. So beginnt die Basislinie in Höhe des Goldpeaks ( $L\alpha$ : 9,71 keV) nicht wie üblich bei null Zählschritten pro Sekunde (cps), sondern bei etwa 0,1 cps.

**Tab. 4-3 S/N-Verhältnisse und Präzision für Gold-Standardlösung bei unterschiedlichen Konzentrationen jeweils mit und ohne PVA-Zugabe zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze; jede Probe wurde auf drei Discs aufgetragen und jeweils 10-mal für 250 sec vermessen**

	Au [ppb]	S/N- Verhältnis (Mittelwert)	Präzision [RSD %] 1 Disc	RSD % <sub>pooled</sub> 1 Disc	Präzision [RSD %] 3 Discs
ohne PVA	250	32,46	1,55 - 2,12	2,00	3,21
0,4% PVA		14,57	1,32 - 3,05	2,15	3,85
ohne PVA	200	22,07	1,01 - 2,93	1,96	8,22
0,4% PVA		10,44	1,22 - 2,36	1,92	2,08
ohne PVA	150	20,25	1,33 - 3,79	2,71	3,03
0,4% PVA		8,79	3,01 - 4,11	3,50	3,43
ohne PVA	100	15,43	2,89 - 4,05	3,62	12,31
0,4% PVA		6,42	2,99 - 3,43	3,22	3,82
ohne PVA	75	13,57	1,89 - 3,49	2,71	4,36
0,4% PVA		4,07	3,71 - 7,24	5,54	5,50
ohne PVA	50	8,13	4,23 - 6,36	5,23	9,18
0,4% PVA		3,39	6,52 - 9,20	8,12	8,24
ohne PVA	25	6,32	11,16 - 12,00	11,46	11,23
0,4% PVA		1,33	16,43 - 30,70	23,89	23,51

Über das Signal-Rausch-Verhältnis sind die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze nun direkt ablesbar. So ist die LOQ bei den Proben ohne PVA bei 75 ppb und bei den Proben mit PVA bei 200 ppb mit einem S/N von  $\geq 10$  erreicht. Die LOD ist für die Proben ohne PVA auch bei 25 ppb noch nicht unterschritten, für die Proben mit PVA hingegen liegt die Detektionsgrenze bei 50 ppb. Die im TXRF-Programm Picofox hinterlegte Formel für die Berechnung der LOD ist jedoch eine Andere (vgl. [295]), sodass hier unterschiedliche Ergebnisse erhalten wurden. Da allerdings die Eignung für die Arzneibuchmonographie gezeigt werden sollte, wurde auch die entsprechende Arzneibuchdefinition verwendet. Diese Uneinigkeit über die Berechnung der Nachweisgrenze in der TXRF ist nicht neu, wie schon von Sánchez [296] diskutiert. Auch bei den Versuchen mit der TXRF zeigt sich (vgl. Tab. 4-3), wie bei den HPLC-Versuchen (vgl. Abschnitt 3.4.1.1), die von Schepers et al. beschriebene Abhängigkeit zwischen der Konzentration und der Präzision [260].

Die aufgeführten Präzisionsdaten zeigen, dass auch bei den hier eingesetzten niedrigen Konzentrationen akzeptable Werte von zumeist  $< 10\%$  relativer Standardabweichung erhalten werden konnten. Weiterhin ist erkennbar, dass sich die Präzision, wie zuvor in Kapitel 4.2.2 diskutiert, nur wenig zwischen den Proben mit und ohne PVA-Zugabe unterscheiden. Eine Ausnahme stellen dabei jedoch die Werte bei 200 und 100 ppb dar. Hier ist der Wert für die RSD % für die Proben ohne PVA deutlich höher als für die solchen mit PVA-Zusatz. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass die Oberfläche wie vermutet durch den PVA-Zusatz gleichmäßiger wurde und somit eine bessere Präzision erreicht werden konnte. Allerdings hätte sich dieses auch bei den anderen Konzentrationen zeigen müssen, was nicht der Fall ist, da bei fast allen anderen Konzentrationen höhere RSD % für die Proben mit PVA ermittelt wurden. Dieses sind mit Ausnahme von 25 ppb nur geringe Unterschiede. Für den deutlichen Unterschied bei 25 ppb gibt es jedoch eine sinnvolle Erklärung: für die Proben mit PVA ist das Signal-Rausch-Verhältnis von 3 schon unterschritten, sodass hier nahezu kein Peak mehr erkennbar war und dementsprechend die Präzision schlecht ist (vgl. Abb. 7-10 im Anhang).

Bei dem Vergleich der gepoolten Präzision der Messungen von einem Probenträger mit der Präzision der drei verwendeten Probenträger der zugehörigen Konzentration sind in den meisten Fällen (mit Ausnahme der schon im vorigen Absatz diskutierten hohen RSD % bei 100 und 200 ppb der Proben ohne PVA) nur geringe Unterschiede feststellbar. Dieses ist ein Zeichen dafür, dass aus dem Aufbringen der Probe auf den Träger nur ein geringer Fehler resultiert.

### 4.3 Bewertung

Bei der Testung des Einflusses unterschiedlicher Parameter auf die Wiederfindung und die Präzision konnte nur der Analysenzeit eine Auswirkung nachgewiesen werden. Mit steigender Analysenzeit wird ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erhalten und auch die Präzision nimmt aus diesem Grund zu. Da allerdings Analysenzeiten von 1000 sec für eine TXRF-Analyse relativ lang sind und nur noch ein geringer Unterschied zwischen dem S/N bei einer Analysenzeit von 250 und 1000 sec festgestellt wurde, wurde 250 sec als die praktikabelste Analysenzeit übernommen. Alle weiteren überprüften Parameter wie die Rotation der Trägerscheiben zwischen den Messungen, ein unterschiedliches aufgetragenes Probenvolumen, die Siliconisierung der Trägerscheiben oder die unterschiedliche Trocknung führten zwar insgesamt gesehen zu einer Variabilität der Messungen, aber es konnte für keinen dieser Parameter ein entscheidender Einfluss registriert werden. Deshalb muss

davon ausgegangen werden, dass all diese Punkte die Gesamtvariabilität der Messungen beeinflussen, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass hierbei noch weitere Parameter eine Rolle spielen.

Es konnte entgegen der Theorie keine eindeutige Verbesserung der Präzision durch PVA-Zusatz beobachtet werden. Allerdings wurde bei den Vergleichsversuchen festgestellt, dass mit PVA-Zusatz deutlich niedrigere Signal-Rausch-Verhältnisse bestimmt werden können als ohne diesen Zusatz, sodass sich der Polyvinylalkohol negativ auf die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze der Methode auswirkt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich die Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse mit den erreichten Präzisionswerten für die Bestimmung von Gold aus Auranofin und auch Gold aus einer Standardlösung zur Metallbestimmung eignet. Die Anforderungen des Monographieentwurfes [35] wurden modifiziert, aber in vergleichbarer Weise umgesetzt. Aus diesem Grund ist ein Vergleich möglich. Die in dem Monographieentwurf geforderten Präzisionswerte für die Eignung von 20 % relativer Standardabweichung für die Wiederholpräzision und 25 % für die Tag-zu-Tag Standardabweichung konnten mit Werten von etwa 8 % deutlich unterboten werden. Hierbei spielte es keine Rolle, ob ein PVA-Zusatz erfolgt ist oder nicht.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Fokus dieser Arbeit lag die Präzision zweier komplett unterschiedlicher Techniken. Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie handelt es sich um eine weit verbreitete und etablierte Technik für die gezeigt werden sollte, dass sie sich für die Proteintrennung und anschließende Quantifizierung unter Einsatz verschiedener Trennmechanismen eignet. Hierbei war das Ziel zu zeigen, dass die Anforderungen für die Qualitätskontrolle von Arzneimitteln von der Protein-HPLC erfüllt werden können. Dafür sind relative Standardabweichungen von  $\leq 2\%$  gefordert [28], welche von bisher gängigen Techniken zur Proteinanalyse wie der Gelelektrophorese nicht erreicht werden konnten. Die Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse ist aus der Röntgenfluoreszenzanalyse hervorgegangen und noch nicht allzu verbreitet. Hierbei lag auch das Hauptaugenmerk auf der Präzision dieser Technik zur Bestimmung von Metallen - in diesem Fall Gold. Allerdings, war das zu erreichende Ziel nicht ganz so hoch gesteckt, wie die nötige Präzision für die Qualitätskontrolle der Proteine. So wird in einem vorliegenden Monographieentwurf für das Europäische Arzneibuch zur Bestimmung von Metallkatalysatoren und Metallreagenzien eine Präzision von  $\leq 20\%$  relativer Standardabweichung für die Wiederholpräzision und von  $\leq 25\%$  relativer Standardabweichung für die Tag-zu-Tag Präzision gefordert [35].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche HPLC-Trennmechanismen zur Analyse und Trennung von Modellproteinen und einem monoklonalen Antikörper eingesetzt. Hierfür wurden zumeist Methoden der Säulenhersteller modifiziert und die entsprechenden Methoden optimiert, um eine bessere Selektivität zu erreichen. Hierdurch konnten in der SAX und WCX die eingesetzten Modellproteine basisliniengetreunt werden. Methoden für die Trennung eines monoklonalen Antikörpers mit Hilfe von SEC, WCX und SAX konnten ebenso optimiert werden, sodass teilweise auch hierbei eine Quantifizierung möglich wurde.

In der TXRF von Gold wurden mögliche Einflussparameter der Probenvorbereitung und Messung auf die Präzision untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur die Analysenzeit einen direkten Einfluss auf die Präzision hat, sodass bei längerer Analysenzeit eine höhere Präzision erreicht werden konnte. Weiterhin wurden für Gold als Analyten sowohl die Wiederhol- als auch die Tag-zu-Tag Präzision bestimmt und der Zusatz von Polyvinylalkohol zur Probe evaluiert. Hierbei zeigte sich, dass der PVA-Zusatz nicht wie erhofft zu einer gleichmäßigeren Probe führte, was sich in einer höheren Präzision widerspiegeln sollte, sondern dabei nahezu kein Unterschied zu der ermittelten Präzision ohne PVA feststellbar war. Allerdings konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass das PVA einen direkten negativen Einfluss auf Nachweis- und Bestimmungsgrenze hat.

Kommt man nun auf die als Titel der Arbeit verwendete Aussage:

### **„Präzision – ein erreichbares Kriterium in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie von Proteinen und der Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse von Metallen“**

zurück, so kann diese mit einem klaren Ausrufezeichen versehen werden. Die geforderten Präzisionswerte für die HPLC von Proteinen konnten mit allen eingesetzten und verglichenen Techniken erreicht werden. Hierbei wurde nicht immer für alle eingesetzten Proteine der geforderte Wert von  $\leq 2\%$  relativer Standardabweichung erreicht, aber in jeder Technik konnte mit mindestens einem Protein diese Grenze unterboten werden, sodass das

gesteckte Ziel erreicht werden konnte. Auch für die TXRF von Metallen lässt sich die oben gestellte Frage mit ja beantworten. Zwar liegt die erreichte Präzision bei dieser Technik zur Goldbestimmung mit einer relativen Standardabweichung von 8 % deutlich höher als in der Protein-HPLC, aber der Anspruch ist in diesem Zusammenhang ein anderer gewesen. So sollte gezeigt werden, dass die im EDQM-Entwurf für das Ph. Eur. geforderte relative Standardabweichung von 20 % erreichbar ist und sich die TXRF somit für die Bestimmung von Metallkatalysatoren und Metallreagenzien eignet.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine hohe Präzision nicht nur bei Trennung von zuvor ausgewählten Modellproteinen möglich ist, sondern auch bei Trennung eines monoklonalen Antikörpers, welcher als praxisnahes Beispiel analysiert wurde. Hierbei konnte nicht nur bewiesen werden, dass eine Quantifizierung möglich ist, sondern auch eine Trennung und Identifizierung unterschiedlicher Aggregate vom Monomer des Antikörpers in der SEC erfolgen kann. In der WCX konnte die Heterogenität der vorliegenden Antikörperprobe detektiert und anschließend die einzelnen Formen identifiziert werden. Hierbei stellte sich heraus, dass es sich um verschiedene Formen des Antikörpers mit unterschiedlichen C-terminalen Lysinresten handelt.

Der abschließende Vergleich der unterschiedlichen Trennmechanismen in der Protein-HPLC gibt einen Überblick über die Stärken und Schwächen der einzelnen Verfahren, was gegebenenfalls bei der Auswahl eines geeigneten Trennmechanismus bei einem Trennproblem unterstützen kann.

Über die bisher erzielten Ergebnisse zur Proteinquantifizierung hinaus könnten noch einige Experimente durchgeführt werden, um den Vergleich der einzelnen Trennmechanismen zu komplettieren. Hierbei sollte die Methode zur Trennung des monoklonalen Antikörpers mit dem schwachen Kationenaustauscher noch weiter optimiert werden, sodass eine getrennte Quantifizierung der einzelnen heterogenen Formen des Antikörpers möglich ist. Hierfür wäre eine weitere Optimierung des Gradienten oder nach einigen Vorversuchen gegebenenfalls doch der Einsatz von einer etwas höheren Temperatur zur Erhöhung der Selektivität denkbar. Außerdem könnte bei dieser Trennung tatsächlich ein interner Standard zugesetzt werden, sodass die erfolgte Normierung überflüssig wird. Gegebenenfalls stellt sich das nach der weiteren Methodenoptimierung auch als nicht notwendig heraus.

Ebenso sollte die Methode der Antikörpertrennung mit der starken Anionenaustauschchromatographie weiter entwickelt werden und eine Identifizierung der erhaltenen Peaks erfolgen, sowie Präzisionsmessungen durchgeführt werden. Für die Identifizierung der Peaks ist hier, wie in der WCX, ein Zusatz von Carboxypeptidase B zur Feststellung der Heterogenität des Antikörpers denkbar. Dieses wäre ein realistischer Schluss, da es sich ja um sehr ähnliche Trennmechanismen handelt, sodass hier ein ähnliches Ergebnis erwartet werden kann. Um einen vollständigen Vergleich aller vier vorgestellten Trennmechanismen zu erhalten sollte noch eine Methode zur Trennung des monoklonalen Antikörpers mit Hilfe der RP-HPLC mit einbezogen werden.

Da sich das Interesse in dieser Materie als relativ hoch herausgestellt hat, sollte der bisher erfolgte Vergleich noch auf andere Trennmechanismen zu Proteinanalyse (vgl. Tab. 2-1) ausgedehnt werden, welche bisher unberücksichtigt geblieben sind. Hierbei liegt der Gedanke an die Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) sehr nah, da sie seit ihrem Auftauchen stetig weiter entwickelt wurde und sehr in den Fokus für die Proteinanalyse gelangt ist.

Bei der Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse ist eine mögliche Optimierung der Präzision durch die Identifizierung weiterer Variationsparameter denkbar. Hierfür könnten beispielsweise noch andere Zusätze zur Probe an Stelle des Polyvinylalkohols untersucht werden. Es könnten auch weitere Einflussparameter durch ein entsprechendes Versuchsdesign, beispielsweise das Plackett-Burman-Design [297], identifiziert werden und anschließend nach der Identifizierung eine Methodenoptimierung oder auch Optimierung der Probenvorbereitung zur Verbesserung der Präzision durchgeführt werden. Auch die Unterschiede der Messungen mit und ohne Polyvinylalkohol könnten noch genauer betrachtet werden, sodass durch weitere Messungen untersucht werden sollte, ob Polyvinylalkohol tatsächlich zu einer gleichmäßigeren Oberfläche führt und somit eine höhere Präzision erreichbar ist.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Instrumentierung und Software

#### 6.1.1 HPLC-Geräte

Die unterschiedlichen HPLC-Versuche wurden an zwei verschiedenen Geräten der Firmen MERCK® Hitachi® und VWR-Hitachi® durchgeführt.

##### 6.1.1.1 MERCK® Hitachi®

Für die Versuche mit dem starken Anionenaustauscher wurde eine HPLC-Anlage der Firma MERCK® Hitachi® verwendet.

Tab. 6-1 Aufbau des MERCK® Hitachi® HPLC Systems

Komponente	Modell	Seriennummer
Pumpe	L-6200A	0312-058
Injektor (manuell)	Rheodyne® 7125	0341-033
Autosampler	AS-2000A	0324-016
Schnittstellenmodul (Interface)	D-6000	0436-012
UV-VIS-Detektor	L-4250	0323-011
Software	HPLC System Manager D-7000	Version 3.1.1.

##### 6.1.1.2 VWR-Hitachi®

Für die Versuche mit dem schwachen Kationenaustauscher sowie der Größenausschlusschromatographie des monoklonalen Antikörpers und der Untersuchung des Einflusses der Probenvorbereitung in der SEC wurden zwei verschiedene LaChrom Elite® HPLC-Anlagen der Firma VWR-Hitachi® verwendet. Auch die Messungen des Antikörpers mit Hilfe des starken Anionenaustauschers wurden mit diesen Geräten vorgenommen.

Tab. 6-2 Aufbau des ersten VWR-Hitachi® HPLC Systems

Komponente	Modell	Seriennummer
Pumpe	L-2130	19E26-036
Autosampler	AS-2203	19E48-030
Schnittstellenmodul (Organizer)	ohne Bezeichnung	19E40-028
UV-VIS-Detektor	L-2400	19E43-005
Software	EZChrom Elite	Version 3.2.1.

Tab. 6-3 Aufbau des zweiten VWR.-Hitachi® HPLC Systems

Komponente	Modell	Seriennummer
Pumpe	L-2130	23E59-002
Autosampler	L-2200	23E90-003
Schnittstellenmodul (Organizer)	ohne Bezeichnung	23E92-012
Dioden-Array-Detektor	L-2455	23E89-001
Entgaser (integriert)	ohne Bezeichnung	ohne Seriennummer
Software	EZChrom Elite	Version 3.3.2.

### 6.1.2 Eingesetzte HPLC-Trennsäulen

#### 6.1.2.1 Anionenaustauschchromatographie

In diesem Trennmodus wurde mit der monolithischen Säule ProSwift® SAX-1S (50 x 4,6 mm) der Firma Dionex (Sunnyville, Kalifornien, USA) gearbeitet. Hierbei handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher auf Polymethacrylatbasis. Die für den Austausch zuständigen funktionellen Gruppen sind quartäre Amine [298]. Ob es sich bei dem Kunststoff um das Methyl-, Ethyl- oder Propylderivat handelt wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben.

#### 6.1.2.2 Größenausschlusschromatographie

Für die SEC wurde, sowohl im idealen als auch im nicht-idealen Modus, eine BioSep™ s-3000 Säule (300 x 7,8 mm) mit zugehörigem SecurityGuard™ Kartuschen System (Kartuschengröße: 4 x 3,0 mm) der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) verwendet. Diese Trennsäule wurde für die Untersuchungen des monoklonalen Antikörpers eingesetzt und auch für die Versuche zum Einfluss der Probenvorbereitung auf die Proteine. Die Säule ist mit 5 µm Partikeln auf Kieselgelbasis gefüllt und die Porengröße liegt bei 290 Å. Die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben. Es wird unter nativen Bedingungen ein Ausschlussbereich von 5000-700000 Dalton für diese Säule angegeben [207].

#### 6.1.2.3 Kationenaustauschchromatographie

Für diesen Trennmechanismus wurde ein schwacher Kationenaustauscher, ProPac® WCX-10 (250 x 4 mm), der Firma Dionex (Sunnyville, Kalifornien, USA) eingesetzt. Dieser ist aus 10 mm nicht-porösen Ethylvinylbenzen-Divinylbenzencopolymerpartikeln aufgebaut, die mit einem weiteren hydrophilen aber neutralen Polymer überzogen sind, um Wechselwirkungen mit den Proteinen zu reduzieren. Die Oberfläche ist mit Carboxylgruppen besetzt, welche für den Austausch verantwortlich sind [299]. Eine Übersicht über unterschiedliche oberflächenaminierte Ethylvinylbenzol-Divinylbenzol Copolymere findet sich in [300].

### 6.1.3 TXRF-Gerät

Die Messungen der Totalreflexionsröntgenfluoreszenz wurden mit einem S2 Picofox TXRF von der Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland durchgeführt. Dieses besteht aus folgenden Bauteilen:

- Molybdän-Keramiktstrahlröhre (Anode, 50 kV, 600 µA)
- Multilayer Monochromator (80 % Reflektivität bei 17,5 keV)
- XFlash® Silicon Drift Detektor (SDD) mit Energieauflösung < 150 eV (MnKα)
- automatischer Probenwechsler mit Interface (RS 232)

Des Weiteren ist ein 9,0 µm Molybdänfilter integriert. Der unveränderliche Winkel für die Totalreflexion betrug 0,1° (Mo-Kα 17,5 keV).

Als Gerätesoftware, welche auch teilweise für die Auswertung der Messdaten genutzt wurde, wurde Picofox Spectra 7.2.0.5 (Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Sie bot die Möglichkeit direkt die Konzentrationen der zu bestimmenden Elemente abzulesen, nachdem die Berechnung über einen internen Standard erfolgt ist.



### 6.1.3.1 Probenträger

Die verwendeten Probenträger für die TXRF-Versuche bestehen aus Quarz oder Plexiglas und wurden vor dem Auftragen der Proben mit Hilfe einer Siliconlösung (10 µl) siliconisiert. Einige Versuche wurden auch mit unsiliconierten Trägern durchgeführt, um den Einfluss der Siliconisierung auf die Präzision und die Wiederfindungsrate zu untersuchen. Dieses ist dann an der entsprechenden Stelle vermerkt.

### 6.1.4 Weitere Geräte und Materialien

- Waagen: Präzisionswaage Sartorius research R 160-P<sup>\*</sup>-D1;  
Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland  
Analysenwaage Mettler PC 4400/9 Delta Range<sup>®</sup>;  
Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
- pH-Meter: Metrohm 632 pH-Meter mit einer Metrohm-Elektrode,  
6,0232,100, pH 0...14, 3M KCl;  
Metrohm GmbH & Co., Filderstadt, Deutschland
- Magnetrührer: IKA-KMO 2464, 106-2200 U/min;  
Jahnke & Kukel KG, Staufien, Deutschland
- Ultraschallbäder: Sonorex RK 102,  
Sonorex Digitec Typ DT 510  
Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin,  
Deutschland
- Schüttler: Reagenzglasschüttler Reax 2000;  
Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach,  
Deutschland
- Inkubator: Vortemp<sup>™</sup> 56 Shaking Incubator;  
Labnet International Inc., Edison, New Jersey, USA
- Spritzen: Injekt<sup>®</sup> 2 ml und 5 ml, Luer Solo;  
B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Kanülen: Sterican<sup>®</sup> 0,90 x 70 mm, 20 G x 2<sup>3</sup>/<sub>4</sub> und 0,80 x  
120 mm, 21 G x 4<sup>3</sup>/<sub>4</sub> ;  
B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Spritzenfilter: Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, CME unsteril, Porengröße  
0,22 µm;  
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Pipetten: Finnpiquette<sup>®</sup> 100-1000 µl;  
Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland  
Eppendorf Research<sup>®</sup> 0,5 – 10 µl, Eppendorf Research<sup>®</sup>  
2 – 20 µl, Eppendorf Research<sup>®</sup> 100 – 1000 µl;

- Reaktionsgefäße:

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg,  
Deutschland  
Mikroreaktionsgefäße (entsprechend Eppendorf-Cups)  
1,5 ml;  
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- UV-Spektrometer:

Specord® 40 n mit WinASPECT® Software;  
Analytik Jena, Jena, Deutschland

### 6.1.5 Auswertung der Messdaten

Die statistischen Auswertungen aller Messergebnisse wurden mit Microsoft™ Excel® (Version 2007 und 2010) durchgeführt. Die Abbildungen, insbesondere die Chromatogramme, wurden mit Microsoft™ Excel®, Word® oder PowerPoint® (Version 2007 und 2010) erstellt. Für alle vorher nötigen Schritte, wie die Integration der Chromatogramme, wurde die zugehörige Gerätesoftware (siehe Abschnitt 6.1.1.1 und 6.1.1.2 für die HPLC-Versuche und Abschnitt 6.1.3 für die TXRF-Versuche) verwendet.

Die bei den HPLC-Messungen erhaltenen Peakflächen sind auf die tatsächlichen Einwaagen der Proteine normiert worden, um Einflüsse der Einwaage unberücksichtigt zu lassen. Hierzu wurden die Peakflächen durch die eingewogene Proteinmenge geteilt.

## 6.2 Reagenzien und Chemikalien

Die aufgeführten Proteine wurden für die zuvor beschriebenen Versuche verwendet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass immer die gleiche Qualität und möglichst auch die gleichen Chargen verwendet wurden, um unterschiedliche Peakformen und somit Unterschiede möglichst gering zu halten.

Tab. 6-4 eingesetzte Modellproteine

Protein	Hersteller	Artikelnummer
BSA (≥ 98%); Albumin aus Rinderserum	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	A3059
β-Casein (≥ 98%); aus Kuhmilch	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	C6905
Cytochrom C (≥ 95%); aus dem Pferdeherz	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	C2506
Lysozym (~88015 U/mg); aus Hühnerei	Fluka/Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	62970
Myoglobin (≥ 90%); aus dem Pferdeherz	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	M1882
Ovalbumin (≥ 98%); aus Hühnerei	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	A5503

Der monoklonale Antikörper vom IgG1-Typ, wurde von der Firma Merck® KGaA, Darmstadt, Deutschland in einer Konzentration von 10 mg/ml in wässriger Lösung zur Verfügung gestellt. Das für die Kationenaustauschchromatographie verwendete Enzym Carboxypeptidase B (> 170 U/mg, 5,0 mg/ml) wurde von der Worthington Biochemical Corporation in Lakewood, USA bezogen.

Tab. 6-5 Reagenzien und Chemikalien der einzelnen Projekte

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
Aceton <sup>d)</sup>	CVH Chemie-Vertrieb, Hannover, Deutschland
2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranosato-S-(triethyl-phosphine) gold(I) (Auranofin) <sup>d)</sup>	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
Brij® 35 <sup>c)</sup>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Citronensäure <sup>b)</sup>	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Dimethylformamid (DMF) <sup>d)</sup>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriummonohydrogenphosphat <sup>b)</sup>	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Dinatriummonohydrogenphosphat-Dihydrat <sup>b,c)</sup>	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Isopropanol <sup>d)</sup>	CVH Chemie-Vertrieb, Hannover, Deutschland
Gold Standardlösung <sup>d)</sup>	Fluka/ Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Yttrium Standardlösung <sup>d)</sup>	Fluka/ Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat <sup>b,c)</sup>	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES, Pufferan®) <sup>b)</sup>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol (HPLC-Qualität) <sup>a,b,c)</sup>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Natriumazid <sup>c)</sup>	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Natriumchlorid <sup>a,b,c)</sup>	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Natriumhydroxid <sup>c)</sup>	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS) <sup>c)</sup>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphorsäure 85% <sup>c)</sup>	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Polyvinylalkohol <sup>d)</sup>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure 37% <sup>a)</sup>	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Siliconlösung <sup>d)</sup>	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Trizma® Base) <sup>a)</sup>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

<sup>a)</sup> verwendet für die Anionenaustauscherversuche (SAX)

<sup>b)</sup> verwendet für die Kationenaustauscherversuche (WCX)

<sup>c)</sup> verwendet für die Größenausschlussversuche (SEC)

<sup>d)</sup> verwendet für die Versuche zur Totalreflektionsröntgenfluoreszenzspektrometrie (TXRF)

Für alle HPLC-Versuche wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Alle Fließmittel wurden vor den Messungen im Ultraschallbad bzw. durch den integrierten Entgaser im VWR® HPLC-System entgast.

Für alle TXRF-Versuche wurde bidestilliertes Wasser eingesetzt. Alle Messungen, sowohl mit der HPLC als auch mit dem TXRF, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

## 6.3 Probenvorbereitung

### 6.3.1 Proteinprobenvorbereitung für die HPLC-Messungen

Die Proteine (Myoglobin, Ovalbumin, BSA,  $\beta$ -Casein, Cytochrom C, Lysozym) wurden auf einer Präzisionswaage einzeln auf Filterpapier eingewogen und anschließend in einen Messkolben überführt. Mit dem entsprechenden Eluenten wurde der Messkolben bis zur Eichmarke befüllt und die Proteine unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades innerhalb einiger Minuten (< 10 min) in Lösung gebracht. Die so entstandenen Lösungen wurden mit

Hilfe der in Kapitel 6.1.4 aufgeführten Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22 µm) filtriert und anschließend in HPLC-Vials überführt.

### 6.3.2 Vorbereitung von Proben mit monoklonalem Antikörper für die HPLC

Der monoklonale Antikörper wird abweichend von den restlichen Proteinen im -80°C-Froster gelagert. Vor dem ersten Einsatz wurde der Antikörper, der mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 50 ml-Behältnissen geliefert wurde, auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die vorliegende Lösung in Mikroreaktionsgefäße aliquotiert (100 µl, 250 µl, 500 µl), mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die weitere Lagerung wieder in den Froster überführt, sodass einzelne Proben entnommen werden konnten. Die Aliquots wurden vor einer Messung auf Eis aufgetaut und im Anschluss mit Fließmittel bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Vor der Überführung in die HPLC-Vials wurden auch diese Proben wie unter 6.3.1 beschrieben filtriert.

### 6.3.3 Vorbereitung der Antikörperproben mit Carboxypeptidase B-Zusatz

Die Aliquots des Antikörpers wurden wie unter 6.3.2 beschrieben hergestellt und aufgetaut. Das Enzym Carboxypeptidase B wurde ebenfalls auf Eis aufgetaut. Es wurden pro Puffersystem zwei Aliquots (Probe und Blindprobe) mit je 250 µl Antikörperlösung verwendet. Die Probenvorbereitung erfolgte analog zur Applikationsvorschrift von Dionex [245]. Zu der eigentlichen Probe wurden 1,25 µl der Carboxypeptidase B-Lösung und für die Blindprobe 1,25 µl demineralisiertes Wasser zugefügt. Die Proben und Blindproben wurden im Mikroreaktionsgefäß kurz homogenisiert und anschließend für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die inkubierten Proben wurden nun mit dem entsprechenden Eluenten A (entweder 10 mM Phosphatpuffer pH 6,0 oder 20 mM MES-Puffer + 60 mM NaCl pH 5,5 – siehe Abschnitt 6.4.3.5) bis zu einer Antikörper-Konzentration von 2,5 mg/ml verdünnt und wie unter 6.3.1 beschrieben filtriert.

### 6.3.4 Vorbereitung der Probenträger für die TXRF-Messungen

Die Probenträger aus Quarz wurden zunächst vor jeder Messung nach der vom Hersteller empfohlenen Methode [301] gereinigt. Hierfür wurde jeder Träger einzeln mit einem Einwegtuch und Aceton von Hand gereinigt und im Anschluss in die mitgelieferte Waschkassette überführt. Die gefüllte Waschkassette wurde nun in eine 5 %-ige Extran®-Lösung gegeben und für etwa 5 Minuten auf einer Heizplatte erwärmt. Anschließend wurde die Waschkassette mit bidestilliertem Wasser gründlich gespült und in 10 %-iger Salpetersäure auf einer Heizplatte für 2 Stunden erwärmt. Es schloss sich ein erneutes Erwärmen in bidestilliertem Wasser an. Nach dem Abspülen mit bidestilliertem Wasser wurden die Probenträger noch in der Waschkassette für etwa 30 Minuten bei 80°C getrocknet, danach noch einmal einzeln mit Aceton gesäubert und waren gebrauchsfertig. Nun wurden die Träger abhängig vom Versuchsdesign siliconisiert oder in ihrer Reinform belassen und zur Kontrolle ihrer Reinheit für 250 sec im Picofox vermessen.

Später wurde die aufwendige Reinigungsmethode vom Hersteller modifiziert und somit stark vereinfacht [283]. Zunächst wurden die Probenträger einzeln liegend mit Isopropanol besprüht. Die Einwirkzeit betrug etwa 5 min. Anschließend wurden die liegenden Träger mit Aceton und bidestilliertem Wasser in gleicher Weise behandelt. Danach wurde jeder Träger von Hand mit einem Einwegtuch und den einzelnen verwendeten Lösemitteln gereinigt, mit bidestilliertem Wasser gründlich abgespült, in die Waschkassette überführt und wiederum unter gleichen Bedingungen im Trockenschrank getrocknet. Die Probenträger wurden wie

oben beschrieben vor der Verwendung mittels Picofox auf Reinheit geprüft, bevor die Probelösung (4 oder 10 µl) aufgetragen wurde.

Die Probenträger aus Plexiglas konnten ohne vorherige Reinigung verwendet werden, da es sich um Einmalartikel handelt. Auch diese wurden vor dem Einsatz durch eine Messung auf Reinheit überprüft.

### **6.3.5 Auranofin-Probenvorbereitung für die TXRF-Messungen**

Das Auranofin wurde eingewogen und in Dimethylformamid gelöst, sodass sich eine Konzentration von 1000 ppm bezogen auf das Gold im Auranofin ergab. Von der erhaltenen Lösung wurde nun, je nach gewünschter Konzentration, das entsprechende Volumen abgenommen, mit Mangan (1000 ppb) und Yttrium (1000 ppb) als interne Standards versetzt und mit Wasser zur gewünschten Konzentration verdünnt. Hierbei betrug das Endgesamtvolumen immer 1000 µl. Die als interne Standards verwendeten Lösungen von Mangan und Yttrium wurden in einer Konzentration von 1000 ppm erworben, sodass diese jeweils vor der Anwendung verdünnt werden mussten. Hierfür wurden 100 µl der erworbenen Lösung mit bidestilliertem Wasser zu 1000 µl verdünnt. Von der erhaltenen Lösung wurden dann anschließend jeweils 100 µl in die Probe eingebracht um die oben beschriebene Konzentration zu erhalten. Es wurde mit Konzentrationen von 10 ppm bis 50 ppb gearbeitet – die Konzentrationsangabe bezieht sich hierbei wiederum auf das Gold im Auranofin.

### **6.3.6 Verdünnung der Goldstandardlösung für TXRF-Messungen**

Die Goldstandardlösung lag in einer Konzentration von 1000 ppm vor. Da mit verschiedenen Goldkonzentrationen (500 ppb bis 0 ppb) gearbeitet wurde, wurden unterschiedliche Volumina der zuvor 1:10 verdünnten Standardlösung, eingesetzt. Dieser Lösung wurden dann, wie in 6.3.5 beschrieben, je 100 µl Mangan- und Yttrium-Standardlösung zur internen Standardisierung zugefügt und die entstandene Lösung anschließend mit bidestilliertem Wasser zu 1000 µl verdünnt. Bei den Versuchen mit Zugabe von Polyvinylalkohol (PVA) wurde immer eine Endkonzentration von 0,4 % PVA im Eppendorfcup verwendet. Hierfür wurde zuvor eine 2 %-ige PVA-Lösung hergestellt, indem 0,8 g PVA in 40 ml bidestilliertem Wasser mit Hilfe eines Ultraschallbades gelöst wurden. Bei Zugabe von PVA wurde das zugesetzte Wasservolumen angepasst, da auch hierbei zu 1000 µl verdünnt wurde und die Volumina der Goldstandardlösung als Probe und die Volumina der internen Standards immer gleich blieben.

## **6.4 Methoden**

### **6.4.1 SAX**

#### **6.4.1.1 Myoglobin, $\beta$ -Casein**

Die für die Gradientenelution nötigen Puffer, Eluent A und B, wurden ausgehend von einer in der Anleitung des Herstellers Dionex [197] beschriebenen Methode hergestellt, indem 1,21 g Tris Base in Wasser gelöst und der pH- Wert der Lösung mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7,6 eingestellt wurde. Diese Lösung wurde dann mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Der so entstandene Tris-HCl Puffer (10 mmol) ist Eluent A. Für den Eluenten B wurden in einem Liter Eluent A 58,44 g (1 mol) Natriumchlorid gelöst und anschließend der pH-Wert auf 7,6 eingestellt.

Die Proteine wurden nach der Einwaage (siehe Abschnitt 6.3.1) in Eluent A gelöst und durch einen linearen Gradienten über fünf Minuten von 98% zu 50% Eluent A bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Das Injektionsvolumen betrug 40 µl und die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 214 nm mit einer Responsezeit von 2,0 sec und einer Frequenz von 20 Hz vermessen. Vor einer weiteren Messung wurde die Säule innerhalb von vier Minuten wieder zu Startkonditionen (98% Eluent A) reequilibriert. Die Proteine wurden in Konzentrationen zwischen 1 mg/ml und 0,1 mg/ml eingewogen und vermessen.

### 6.4.1.2 Myoglobin, Ovalbumin, BSA

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurden die in Abschnitt 6.4.1.1 beschriebenen Eluenten und Bedingungen verwendet, die jedoch im Laufe der Zeit wie folgt weiterentwickelt wurden: Die Pufferherstellung erfolgte analog zu 6.4.1.1 mit dem Unterschied, dass nun ein 20 mmol Tris-HCl Puffer eingesetzt wurde. Hierfür wurden 2,42 g Tris Base eingewogen und der pH-Wert anschließend auf 8,6 eingestellt und mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Für den Eluenten B wurden einem Liter Eluent A erneut 1 mol Natriumchlorid (siehe unter 6.4.1.1) zugesetzt. Die Proteine wurden auch bei diesen Versuchen ausschließlich in Eluent A gelöst.

Die in Abschnitt 6.4.1.1 beschriebenen Bedingungen wurden auch für diese Proteine verwendet. Abweichend von dieser Methode wurden jedoch 60 µl der Probelösung injiziert. Um sicherzustellen, dass keine Rückstände auf der Säule verbleiben wurde der Salzgradient nach einer Messung innerhalb von zehn Minuten bis 100% Eluent B gefahren. Im Anschluss wurde die Trennsäule innerhalb von fünf Minuten zu Startkonditionen reequilibriert und mit dieser Fließmittelzusammensetzung noch weitere fünf Minuten gespült, so dass sich eine Analysendauer inklusive Equilibration von 25 Minuten ergab. Die Proteine wurden in Konzentrationen von 1 mg/ml bis 0,001 mg/ml eingesetzt. Um die beste Detektionswellenlänge zu finden, wurden auch noch Messungen bei 210, 254 und 280 nm durchgeführt. Die Messungen erfolgten jeweils bei einer Responsezeit von 2,0 sec und einer Frequenz von 20 Hz.

### 6.4.1.3 Monoklonaler Antikörper

Die Eluentenherstellung erfolgte auf gleiche Weise wie in 6.4.1.1 beschrieben. Es wurde wiederum ein 10 mM Tris-HCl Puffer als Eluent A und ebendieser Puffer mit 1 M Natriumchlorid als Eluent B verwendet. Bei der Methodenentwicklung wurden die Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 8,0; 7,5; 7,0) hergestellt und getestet. Ebenso wurden Messungen mit einem Eluentensystem basierend auf 10 mM Phosphatpuffer durchgeführt. Für die Herstellung des Eluenten A wurden 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat zu 1000 ml Wasser gelöst nachdem der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure eingestellt wurde. Eluent B wurde durch Zusatz von 1 M Natriumchlorid (58,44 g) in Eluent A mit anschließender pH-Wert Einstellung hergestellt. Dieses Eluentensystem wurde mit unterschiedlichen pH-Werten (6,0; 6,5; 7,0) hergestellt und vermessen. Der monoklonale Antikörper wurde wie unter 6.3.2 beschrieben vorbehandelt und bei allen Puffersystemen mit 100 % Eluent A zur gewünschten Konzentration von 2,5 mg/ml verdünnt.

Für die Elution des Antikörpers wurden verschiedene Gradienten der Fließmittel A und B jeweils innerhalb von 30 min eingesetzt (2-50 % B; 0-30 % B; 0-10 % B; 0-5 % B). Anschließend wurde die Trennsäule von stärker haftenden Rückständen befreit indem der Anteil an Eluent B auf 100 % innerhalb von 15 min erhöht wurde und danach für 15 min zu Startkonditionen reequilibriert wurde. Die Flussrate betrug 0,5 oder 1 ml/min und es wurden

entweder 10, 20, 40 oder 60 µl injiziert. Die Detektion erfolgte bei 214 nm mit einer Responsezeit von 2,0 sec und einer Frequenz von 20 Hz.

## **6.4.2 SEC**

### **6.4.2.1 Ideale SEC**

Die ideale SEC wurde mit einer Pufferlösung pH 6,6 R nach dem Europäischen Arzneibuch [80,183] durchgeführt. Die mobile Phase wurde hergestellt indem 250 ml 0,2-molare Natriumdihydrogenphosphatlösung mit 89 ml 0,2-molarer Natriumhydroxidlösung und 0,3 mol Natriumchlorid gemischt und auf 1000 ml aufgefüllt wurden. Anschließend wurde der pH-Wert überprüft und wenn nötig mit Phosphorsäure oder Natriumhydroxidlösung auf 6,6 korrigiert. Die Modellproteine Myoglobin, Ovalbumin und BSA wurden wie unter Abschnitt 6.3.1 beschrieben vorbereitet und die Probelösungen (Proteine einzeln oder gemeinsam in Konzentrationen von 0,5 bis 1 mg/ml) anschließend vermessen.

Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min innerhalb von 20 min isokratisch eluiert, nachdem 60 µl der Probe injiziert wurden. Die Detektionswellenlänge war 214 nm mit einer Responsezeit von 1,0 sec und einer Frequenz von 10 Hz.

### **6.4.2.2 Nicht-Ideale SEC**

Die mobile Phase für den nicht-idealen Modus mit einer Ionenstärke von 17-18 mM, wurde hergestellt indem 2,181 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,992 g Dinatriummonohydrogenphosphat und 8,2 g Natriumchlorid zu 1000 ml Wasser gelöst wurden. 100 ml dieser Lösung wurden dann erneut mit Wasser zu 1000 ml verdünnt, nachdem der pH-Wert mit Phosphorsäure auf 6,35 eingestellt wurde [183]. Die Modellproteine Myoglobin, Ovalbumin und BSA wurden wie unter Abschnitt 6.3.1 beschrieben vorbehandelt und die Probelösungen (Proteine einzeln oder gemeinsam in Konzentrationen von 0,5 bis 1 mg/ml) anschließend vermessen.

Mit einer Flussrate von 1 ml/min wurden die Proteine mit isokratischer Elution innerhalb von 20 min eluiert und bei 214 nm mit einer Responsezeit von 1,0 sec und einer Frequenz von 10 oder 20 Hz detektiert. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl.

### **6.4.2.3 Brij- und SDS-Zusatz**

In beiden beschriebenen SEC-Modi wurden die Proteine Myoglobin, Ovalbumin und BSA sowohl einzeln, als auch gemeinsam (Myoglobin und Ovalbumin bzw., alle drei Proteine) in einer Konzentration von 1 mg/ml mit Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen Brij 35 (0,005-5 %) und SDS (0,005-0,5 %) vermessen. Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu Abschnitt 6.3.1; mit der Ausnahme, dass die Behandlung im Ultraschallbad unterblieb, da die Tenside direkt der Probe zugesetzt wurden.

Die Methoden wurden genauso verwendet wie unter Abschnitt 6.4.2.1 für den idealen Modus und unter 6.4.2.2 für den nicht-idealen Modus beschrieben.

### **6.4.2.4 Monoklonaler Antikörper**

In Anlehnung an die BioSep SEC Anleitung [207] wurde als Fließmittel ein 100 mM Phosphatpuffer hergestellt indem 14,20 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat in Wasser gelöst wurden. Der pH-Wert wurde mit Phosphorsäure auf pH 6,8 eingestellt und im 1-Liter Messkolben wurde anschließend mit Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt.

Die Proben wurden wie unter 6.3.2 beschrieben vorbereitet und unter isokratischer Elution mit einer Flussrate von 1 ml/min innerhalb von 16 Minuten analysiert. Das Injektionsvolumen betrug bei allen Untersuchungen 10 oder 25 µl bei einer Detektionswellenlänge von 214 nm mit einer Responsezeit von 1,0 sec und einer Frequenz von 20 Hz. Der Antikörper wurde in Konzentrationen von 2,5 mg/ml und 3,33 mg/ml vermessen.

Zur Größenbestimmung des Antikörpers und dessen Aggregaten wurde die Trennsäule unter den oben genannten Bedingungen kalibriert, indem die Molekulargewichte gegen die Retentionszeit, bzw. das Elutionsvolumen aufgetragen wurden. Hierfür wurden die Modellproteine Ovalbumin und BSA, sowie Natriumazid, zur Bestimmung des Totvolumens der Säule, einzeln vermessen.

### 6.4.3 WCX

#### 6.4.3.1 Myoglobin, Ovalbumin, BSA

Ausgehend von einer Standardmethode des Herstellers zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Säule [299] wurden verschiedene Puffersysteme (Eluent A und B) unter Nutzung des publizierten Gradienten verwendet. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 100 % A bis 68 % A mit zwei Eluenten, A und B, in 14 Minuten bei einer Flussrate von 1 ml/min, allerdings wurde die Endkomposition abweichend von der Vorschrift noch 2 min gehalten. Nach diesem Gradienten schloss sich ein weiterer Gradient bis 100 % Eluent B an, damit stärker haftende Proteine von der Säule entfernt wurden, bevor die Reequilibrierung begann. Hierbei war jeweils Eluent A der Puffer mit der niedrigeren Ionenstärke und Eluent B wurde aus Eluent A mit 1 M Natriumchlorid-Zusatz (Einwaage: 58,44 g) auf 1 l hergestellt. Eine Ausnahme stellt der Phosphatpuffer pH 4,5 dar – hier wurde zur Erhöhung der Ionenstärke 0,5 M (Einwaage: 68,04 g) Kaliumdihydrogenphosphat ergänzt. Die Puffersysteme waren:

- 20 mM Phosphatpuffer pH 6,0 (Einwaage Dinatriumhydrogenphosphat: 2,839 g in 1000 ml; pH-Wert Einstellung mit konzentrierter Salpetersäure; Eluent B: Eluent A + 1 M NaCl)
- 20 mM Phosphatpuffer pH 3,5 (Einwaage Kaliumdihydrogenphosphat: 2,722 g in 1000 ml; pH-Wert Einstellung mit konzentrierter Salpetersäure; Eluent B: Eluent A + 1 M NaCl)
- 20 mM Phosphatpuffer pH 4,5 (Einwaage Kaliumdihydrogenphosphat: 2,722 g in 1000 ml; pH-Wert Einstellung mit konzentrierter Salpetersäure; Eluent B: Eluent A + 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 20 mM Citratpuffer pH 3,5 (Einwaage Citronensäure: 3,843 g in 1000 ml; pH-Wert Einstellung mit 1 M Natriumhydroxidlösung; Eluent B: Eluent A + 1 M NaCl)
- 17 mM Phosphatpuffer pH 6,35 (Her- und Einstellung wie in Abschnitt 6.4.2.2 beschrieben für Eluent A; Eluent B: Eluent A + 1 M NaCl)

Die Proteine wurden wie in Abschnitt 6.3.1 beschrieben vorbehandelt und jeweils (einzeln oder gemeinsam mit einer Konzentration von 1 mg/ml) in dem entsprechenden Eluenten A gelöst. Nach jeder Gradientenelution wurde die Trennsäule innerhalb von 20 min zu Startkonditionen reequilibriert. Das Injektionsvolumen betrug 10 oder 25 µl. Für die Detektion wurden die Wellenlängen 210, 214, 254 und 280 nm getestet. Folgende Messungen wurden jedoch bei 214 nm durchgeführt mit einer Responsezeit von 2,0 sec und einer Frequenz von 20 Hz.



#### 6.4.3.2 Myoglobin und Ovalbumin

Die Proteine wurden wie in Abschnitt 6.3.1 beschrieben vorbereitet und mit einer Konzentration von 0,5 oder 1 mg/ml in Eluent A gelöst. Dieses war ein 17-18 mM Phosphatpuffer (Herstellung wie in Abschnitt 6.4.2.2 beschrieben für Eluent A), allerdings wurde der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH 6,0, 5,5 oder 5,0 eingestellt. Eluent B bestand aus Eluent A mit 1 M Natriumchlorid (58,44 g in 1000 ml), ebenfalls zugehörig zu Eluent A mit einem pH-Wert von 6,35 oder 6,0.

Die Proteine wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min durch einen linearen Gradienten von 98 – 68 % A in 14 min getrennt. Anschließend wurde die Trennsäule in 20 min wieder zu Startkonditionen reequilibriert. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl und die Detektion erfolgte bei 214 nm mit einer Responsezeit von 2,0 sec und einer Frequenz von 20 Hz.

#### **UV-Messungen**

Zur Prüfung der Eigenabsorption der unterschiedlichen Puffersysteme aus den Abschnitten 6.4.3.1 und 6.4.3.2 wurden UV-Messungen durchgeführt. Hierbei diente demineralisiertes Wasser als Referenz. Es wurde jeweils ein Spektrum von 200 bis 300 nm aufgenommen und die Werte für die Absorptionen bei 210, 214, 254 und 280 nm wurden gesondert notiert.

#### 6.4.3.3 Ovalbumin, Cytochrom C, Lysozym

Die drei Modellproteine wurden wie in Abschnitt 6.3.1 beschrieben in Eluent A vorbereitet und mit Hilfe eines Salzgradienten vermessen. Hierfür wurden zwei Eluenten A und B (A: 17 mM Phosphatpuffer, B: 17 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl) analog zu dem in Abschnitt 6.4.2.2 beschriebenen Puffer hergestellt. Allerdings wurde der pH-Wert mit Salpetersäure abweichend auf 6,00 eingestellt. Für den Eluenten B wurden noch 58,44 g Natriumchlorid ergänzt und vor dem Auffüllen auf 1000 ml der pH-Wert mit konzentrierter Salpetersäure auf 6,00 eingestellt.

Das Injektionsvolumen betrug 25 µl und die Proteine (Konzentration: 0,01 bis 1 mg/ml) wurden mit einem linearen Gradienten von 98-68 % A in 14 min vermessen. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde diese Eluentenzusammensetzung noch drei Minuten gehalten, bevor die Säulenreequilibration für 18 min startete. Die Detektionswellenlänge war 214 nm mit einer Responsezeit von 1,0 sec und einer Frequenz von 20 Hertz.

#### 6.4.3.4 Monoklonaler Antikörper

Für den monoklonalen Antikörper wurden drei verschiedene Methoden getestet, die nach einer Literaturrecherche vielversprechend aussahen.

- **Methode 1**

Analog zur einer Vorschrift des Säulenherstellers Dionex [242] wurden die beiden zur Gradientenelution nötigen Eluenten hergestellt, indem für Eluent A (10 mM Phosphatpuffer) 1,420 g Dinatriumhydrogenphosphat eingewogen und in Wasser gelöst wurde. Vor dem Auffüllen auf 1000 ml wurde der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure auf 6,0 eingestellt. Eluent B (10 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl) wurde in gleicher Weise jedoch mit zusätzlich 58,44 g Natriumchlorid zur Erhöhung der Ionenstärke hergestellt. Der pH-Wert wurde wiederum mit konzentrierter Phosphorsäure auf 6,0 eingestellt. Der monoklonale Antikörper wurde wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben vorbehandelt und mit Eluent A zu einer Konzentration von 2,5 mg/ml verdünnt.

Für die Antikörper-Elution wurden verschiedene Gradienten verwendet (4-75 % B, 4-40 % B, 5-13 % B, 7-12 % B, 7-10 % B in 40 min; 5-20 % B, 5-15 % B in 30 min). Anschließend wurde die Trennsäule innerhalb von 15 min wieder zu Startkonditionen reequilibriert. Es wurde bei Flussraten von 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5 und 1 ml/min mit und ohne Flussratengradient zusätzlich zum Salzgradienten gearbeitet. Für den Salzgradienten wurden die aufgeführten niedrigen Flussraten verwendet, die anschließende Säulenreequilibration wurde immer mit einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt, damit nicht allzu viel Zeit in Anspruch genommen wird. Das Injektionsvolumen betrug bei allen Untersuchungen 10 µl bei Detektionswellenlängen von 214, 254 und 280 nm mit einer Responsezeit von 1,0 sec und einer Frequenz von 20 Hz.

- **Methode 2**

In Anlehnung an eine in der Säulenanleitung des Herstellers angegebenen Methode [246] wurden für eine weitere Gradientenelution zwei MES-Puffer hergestellt. Zunächst wurde ein Urpuffer mit 200 mM MES hergestellt, für den 39,04 g Substanz in 1000 ml gelöst wurden. Hiervon wurden für den Eluenten A (20 mM MES + 60 mM NaCl) 100 ml mit 3,506 g Natriumchlorid mit demineralisiertem Wasser zu 1000 ml verdünnt, nachdem der pH-Wert mit 1 M Natriumhydroxidlösung auf 5,5 eingestellt wurde. Die einmolare Natriumhydroxidlösung wurde hergestellt indem 4,20 g Natriumhydroxidplättchen in demineralisiertem Wasser zu 100 ml gelöst wurden. Für den Eluenten B (20 mM MES + 180 mM NaCl) wurden ebenfalls 100 ml des MES-Urpuffers verwendet. Hinzugefügt wurden vor dem Verdünnen zu 1000 ml noch 10,52 g Natriumchlorid. Der pH-Wert wurde wie bei Eluent A beschrieben eingestellt. Die Antikörperproben wurden in gleicher Weise wie unter Methode 1 beschrieben verwendet.

Auch bei dieser Methode wurden verschiedene Gradienten (55-85 % B, 40-70 % B, 45-65 % B, 48-63 % B, 49-60 % B, 48-58 % B in 50 min; 50-70 % B in 30 min) während der Methodenentwicklung zur Antikörper-Elution verwendet. Die Trennsäule wurde nach Ende des Gradienten in 15 min wieder zu Startkonditionen reequilibriert. Die Flussrate betrug 0,5 oder 1 ml/min. Bei allen Untersuchungen betrug das Injektionsvolumen 10 µl. Die Detektion erfolgte bei 214, 254 und 280 nm mit einer Responsezeit von 1,0 sec und einer Frequenz von 20 Hz.

- **Methode 3**

Ebenfalls der Säulenanleitung des Herstellers [247] wurde die dritte Methode entnommen, bei der zwei weitere MES-Puffer zum Einsatz kamen. Es wurde der gleiche MES-Urpuffer wie bei Methode 2 beschrieben (Herstellung siehe unter Methode 2) verwendet. Eluent A (20 mM MES) wurde hergestellt indem 100 ml des MES-Urpuffers mit demineralisiertem Wasser zu einem Liter verdünnt wurden, nachdem der pH-Wert der Lösung mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf 6,5 eingestellt wurde. Eluent B (20 mM MES + 200 mM NaCl) wurde hergestellt indem 100 ml MES-Urpuffer mit 11,688 g Natriumchlorid versetzt wurden und diese Mischung zu 1000 ml verdünnt wurde, nachdem der pH-Wert der Lösung

auf 6,5 eingestellt wurde. Die Antikörperproben wurden in gleicher Weise wie unter Methode 1 beschrieben verwendet.

Für die Elution des Antikörpers wurde ein Gradient von 0-35 % B in 35 min bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Trennsäule wurde im Anschluss für 13 min zu Startkonditionen reequilibriert. Es wurden jeweils 10 µl der Probe injiziert. Die Detektion erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie schon unter Methode 1 und 2 beschrieben.

### **UV-Messungen**

Mit den Eluenten der beschriebenen Methoden 1 und 2 wurden UV-Messungen durchgeführt. Hierbei diente demineralisiertes Wasser als Referenz. Es wurde jeweils ein Spektrum von 200 bis 300 nm aufgenommen, wobei die Werte bei 214 und 280 nm einzeln notiert wurden.

#### **6.4.3.5 Monoklonaler Antikörper mit Carboxypeptidase B**

Die Antikörperproben und die Blindproben wurden wie in Kapitel 6.3.3 beschrieben vorbereitet und mit den weiter entwickelten Methoden 1 und 2 analysiert. Methode 1 wurde mit einem Gradienten von 7 bis 10 % Eluent B bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Alle weiteren Bedingungen wie Injektionsvolumen und Detektion wurden wie in Kapitel 6.4.3.4 unter Methode 1 beschrieben beibehalten. Methode 2 wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem Gradienten von 48-58 % B eingesetzt. Auch hier wurden alle weiteren Bedingungen wie in Kapitel 6.4.3.4 unter Methode 2 beschrieben beibehalten.

### **6.4.4 TXRF**

Alle Messungen, sowohl mit Auranofin als auch mit Goldstandardlösung, wurden bei einer Spannung von 50 kV und einem Strom von entweder 600 oder 750 µA durchgeführt. Zur Auswertung wurde bei allen Messserien der „optimized fit“ der Picofox-Software herangezogen.

#### **6.4.4.1 Auranofin – Bestimmung von Wiederfindungsrate und Signal/Rausch-Verhältnissen**

Die Auranofinproben wurden in Konzentrationen von 0,1 bis 10 ppm (bezogen auf das im Auranofin enthaltene Gold), wie in Abschnitt 6.3.5 beschrieben, vorbereitet und 10 µl der entsprechenden Probelösung wurde auf den zuvor siliconisierten Quarzglassträger (für die Trägervorbereitung siehe Abschnitt 6.3.4) aufgebracht. Die Träger wurden anschließend für 20 min bei 80°C im Trockenschrank getrocknet bevor sie für 250 sec vermessen wurden. Jede Probelösung wurde auf zwei Träger aufgebracht und jeder Träger wurde je dreimal vermessen. Die zur Messung verwendete Methode umfasste die folgenden Elemente: Si, P, S, Cl, Ar, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Mo, Ba, Au.

#### **6.4.4.2 Auranofin – Einfluss von Probenvorbereitung und Zeit auf die Präzision**

Die Proben wurden in einer Konzentration von 10 ppm wie in Abschnitt 6.3.5 beschrieben vorbereitet. Allerdings wurden bei dieser Messserie verschiedene Parameter variiert. Es wurden siliconisierte oder unsiliconisierte Träger verwendet, das aufgetragene Probenvolumen betrug 4 oder 10 µl, die Proben wurden entweder für 20 min bei 80°C im Trockenschrank oder bei Raumtemperatur bis zur kompletten Trockenheit getrocknet. Jede

Probe wurde auf zwei in der gleichen Weise vorbereiteten Träger aufgebracht und jeder Träger wurde je Trägerposition im Gerät von 0°, 90°, 180° und 270° fünfmal bei unterschiedlichen Analysenzeiten (10 sec, 100 sec, 250 sec, 500 sec und 1000 sec) vermessen. Ein Schema zur Verdeutlichung befindet sich im Anhang (vgl. Abb. 7-6). Die Methode umfasste die gleichen Elemente wie die in Abschnitt 6.4.4.1 beschriebene.

### **6.4.4.3 Gold-Standardlösung – Präzision mit und ohne Zugabe von Polyvinylalkohol**

Für die erste Versuchsserie wurde die Gold-Standardlösung wie in Abschnitt 6.3.6 beschrieben bis zu einer Konzentration von 500 ppb verdünnt. In der zweiten Serie wurde Polyvinylalkohol (PVA) zugefügt (Endkonzentration 0,4 %), die Goldkonzentration betrug ebenfalls 500 ppb. In jeder Serie (mit und ohne PVA) wurden fünf Probelösungen auf die gleiche Weise, aber unabhängig voneinander, hergestellt. Jede Probelösung wurde auf fünf Quarzglas-träger aufgetragen (4 µl), sodass pro Serie die vorhandenen 25 Träger ausgenutzt wurden. Jeder Träger wurde 25-mal für je 250 sec vermessen, nachdem die Träger für 20 min bei 80°C im Trockenschrank getrocknet wurden. Die verwendete Methode beinhaltete die folgenden Elemente: Si, P, S, Cl, Ca, Mn, Fe, Ni, Zn, Rb, Y, Mo und Au.

Weiterhin wurde in zwei weiteren Serien je eine Probe mit und ohne PVA auf 25 Träger aufgetragen und jeder Träger wurde 25-mal vermessen. Alle weiteren Parameter zur Probenvorbereitung und Messung waren wie im ersten Absatz dieses Abschnittes beschrieben.

### **6.4.4.4 Gold-Standardlösung – Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Die Proben zur Bestimmung von LOQ und LOD der Gold-Standardlösung wurden wie in Abschnitt 6.3.6 beschrieben einmal mit PVA und einmal ohne PVA-Zugabe (Endkonzentration 0,4 %) in Konzentrationen von 250 bis 0 ppb hergestellt. Jede Konzentration aus beiden Serien wurde auf drei siliconisierte Träger aufgebracht (4 µl) und jeder Träger wurde 10-mal für 250 sec vermessen, nachdem sie für etwa 20 min bei 80°C im Trockenschrank getrocknet wurden. Die verwendete Methode beinhaltete die gleichen Elemente wie die beschriebene Methode in Abschnitt 6.4.4.3.

## 7 Anhang

zu Kapitel 3.2.2.1:

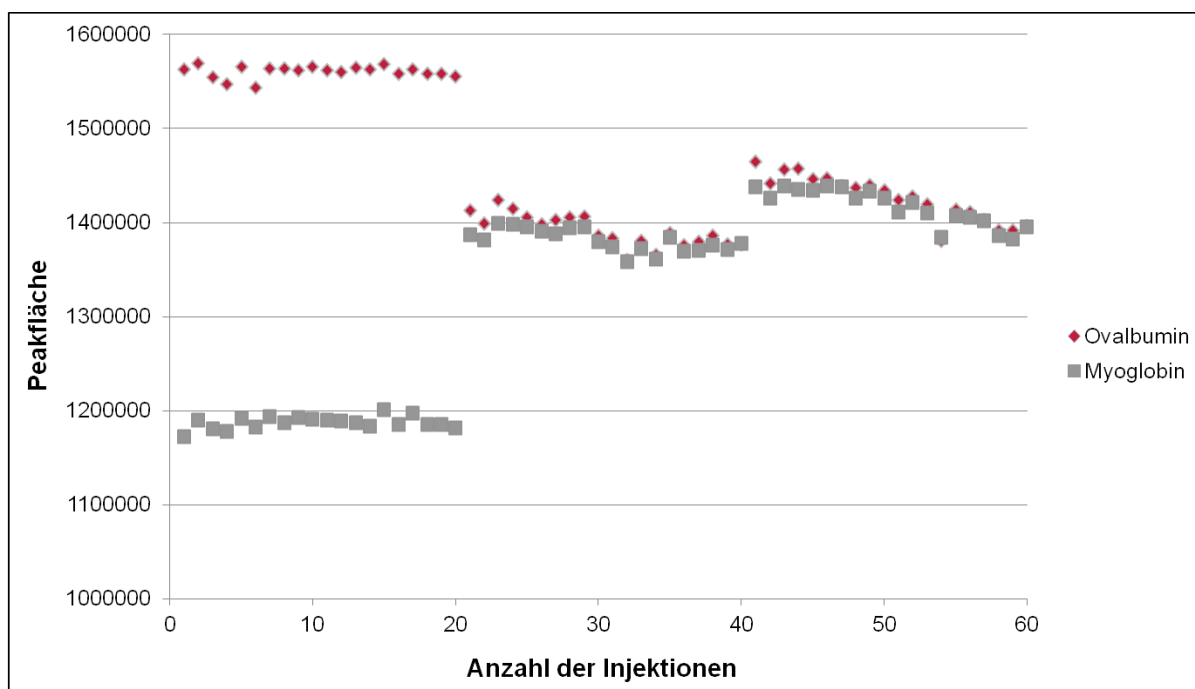


Abb. 7-1 Kontrollkarte der Tag-zu-Tag Präzision der Peakflächen der Trennung von Myoglobin und Ovalbumin mit der Säule BioSep™ s-3000 von Phenomenex im Modus der nicht-idealen SEC

zu Kapitel 3.2.3.1:

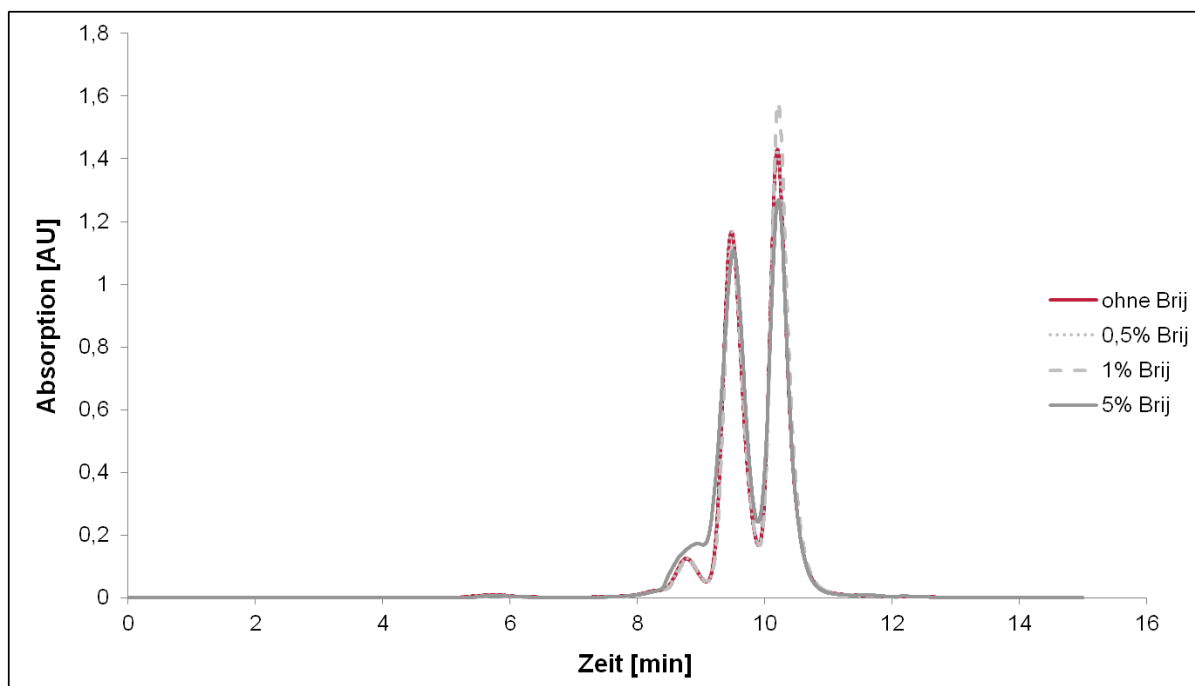


Abb. 7-2 SEC-Trennung von Myoglobin (Peak 2) und Ovalbumin (Peak 1) im idealen Modus mit und ohne Brij-Zusatz

## zu Kapitel 3.2.5.2:

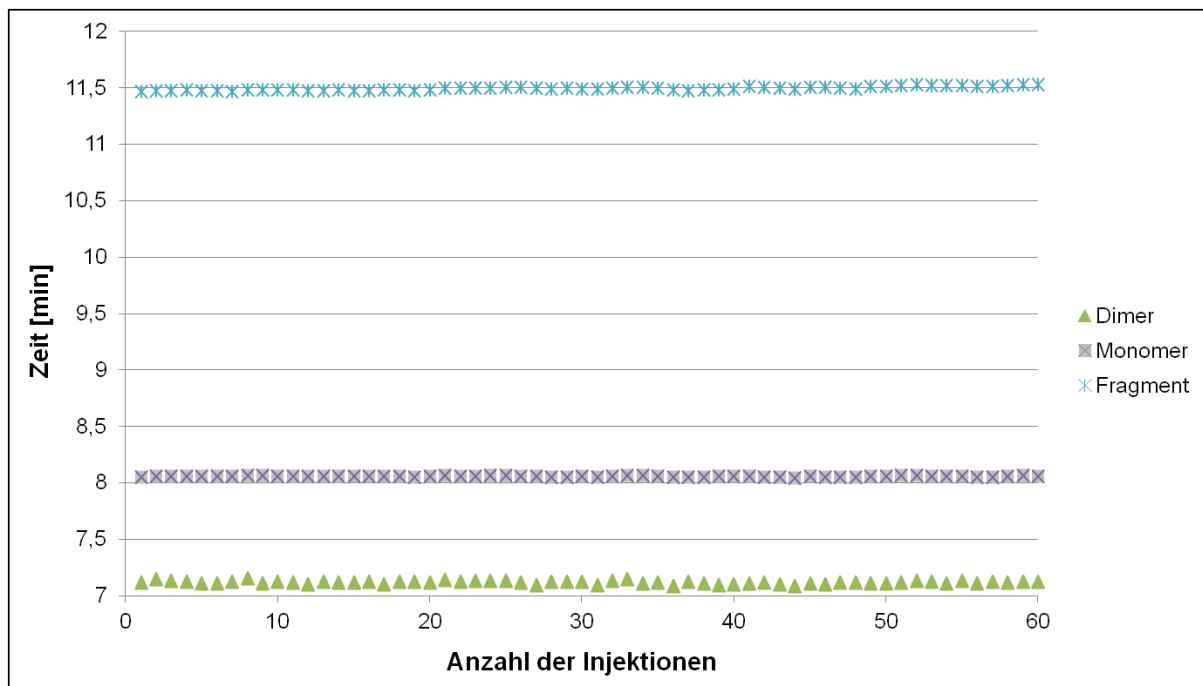


Abb. 7-3 Kontrollkarte der Tag-zu-Tag Präzision der Retentionszeiten der SEC-Messungen des monoklonalen Antikörpers

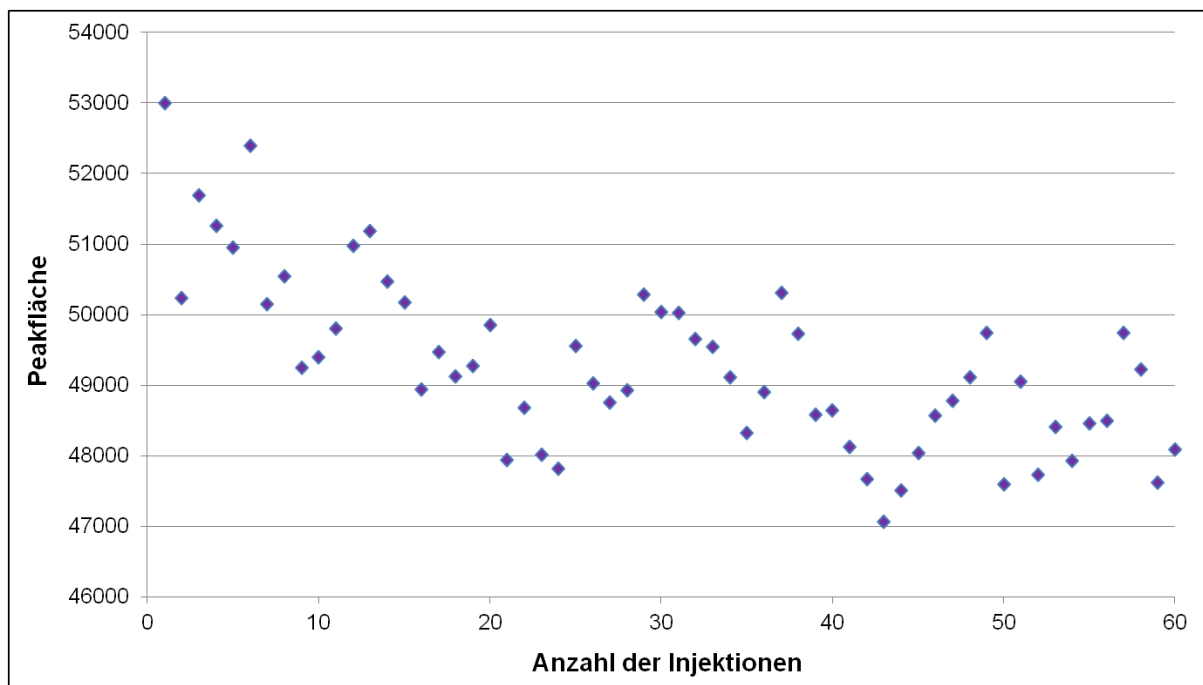


Abb. 7-4 Kontrollkarte der Tag-zu-Tag Präzision der Peakflächen des Dimers der SEC-Messungen des monoklonalen Antikörpers

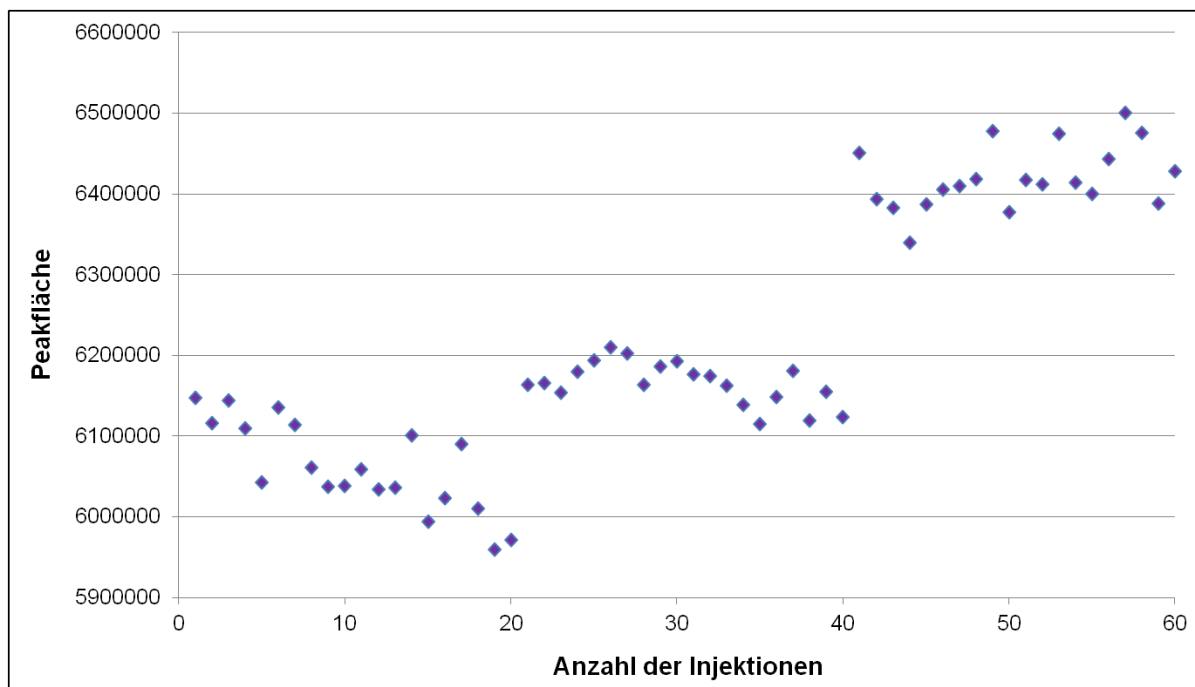


Abb. 7-5 Kontrollkarte der Tag-zu-Tag Präzision der Peakflächen des Fragments der SEC-Messungen des monoklonalen Antikörpers

zu Kapitel 4.1.2:

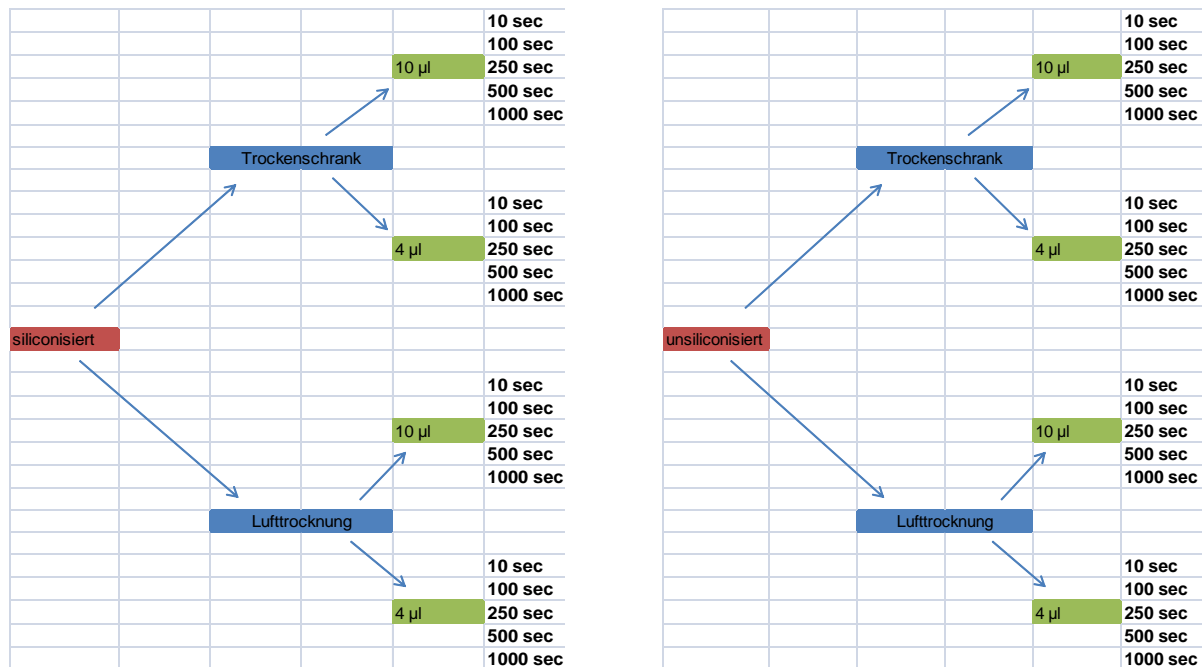


Abb. 7-6 Schema zur Untersuchung unterschiedlicher Einflussfaktoren auf Präzision und Wiederfindungsrate

zu Kapitel 4.1.2.1:

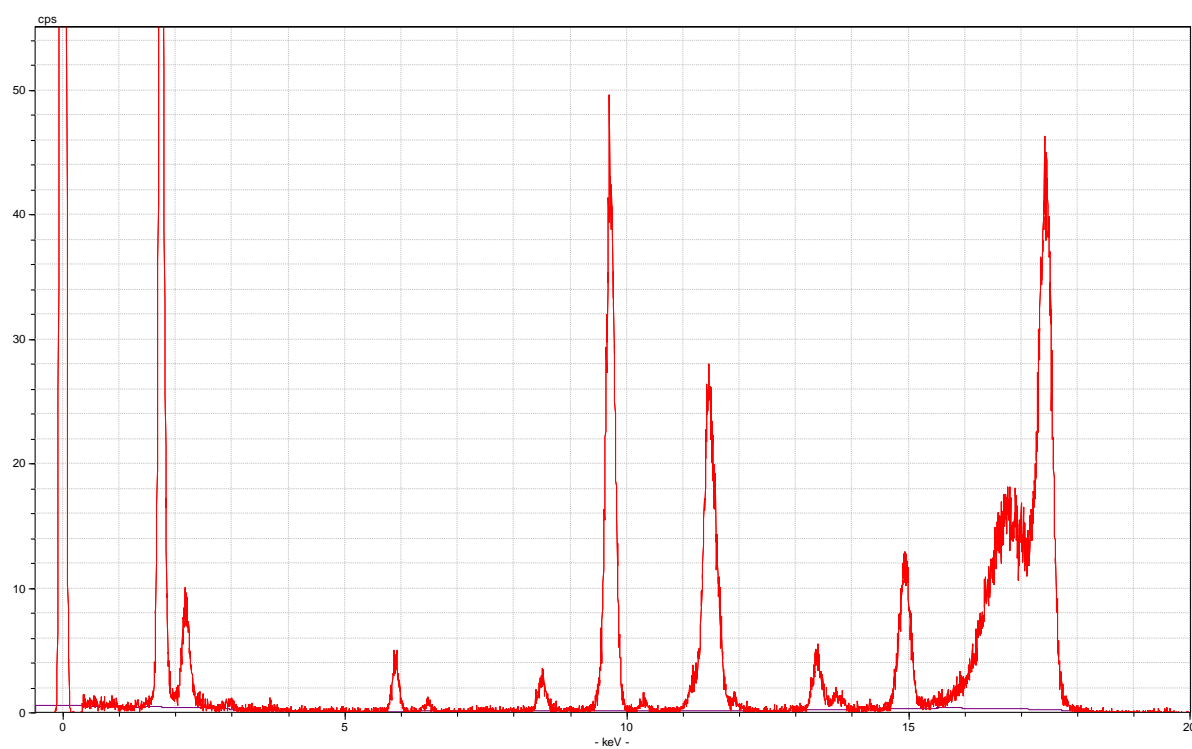


Abb. 7-7 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 10 sec Analysenzeit

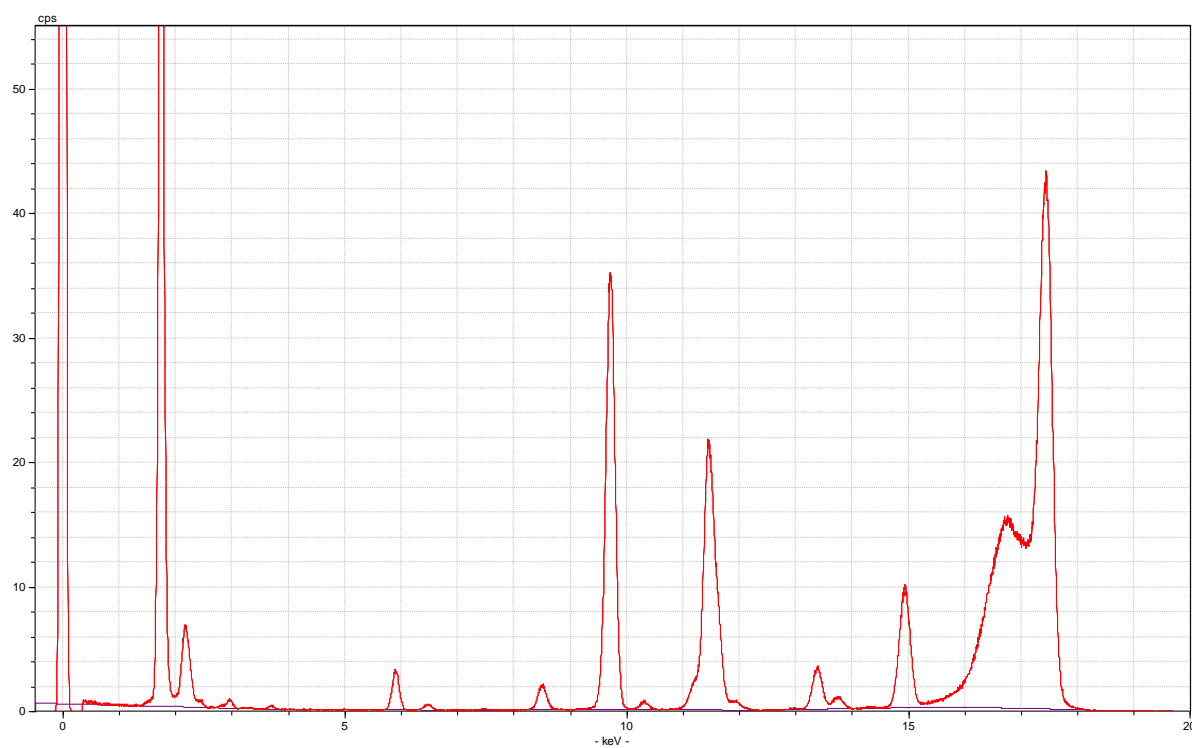


Abb. 7-8 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 250 sec Analysenzeit



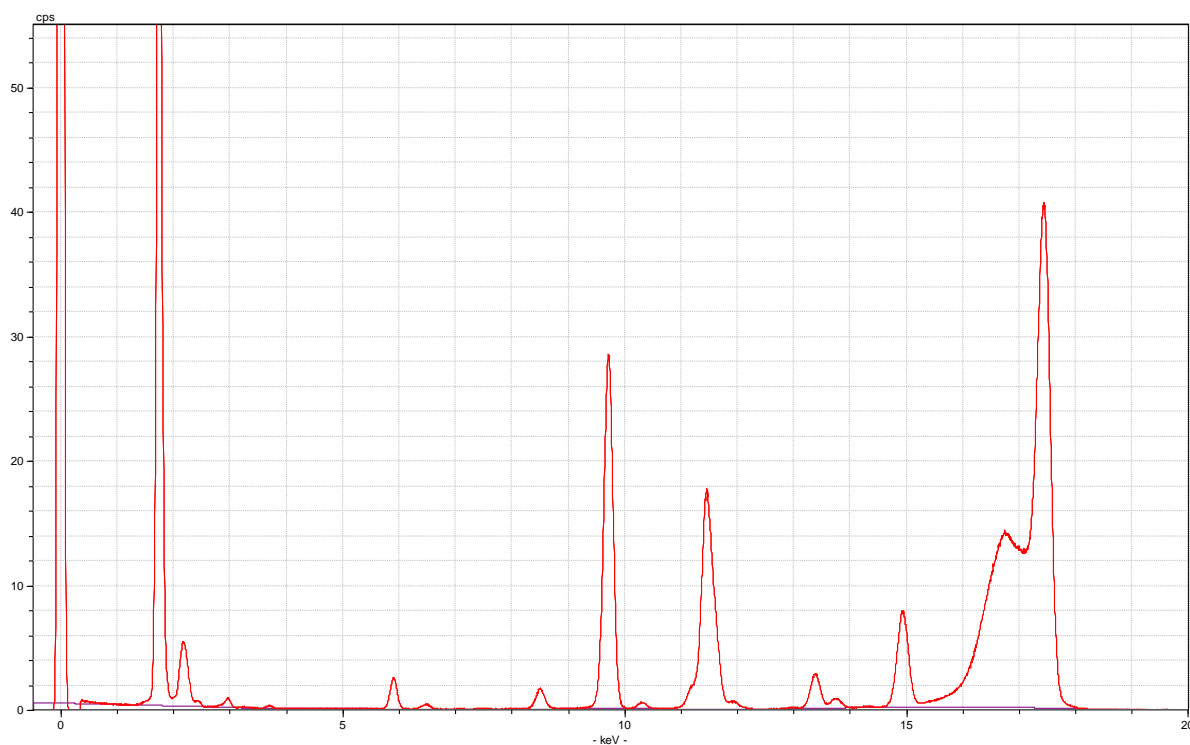


Abb. 7-9 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 1000 sec Analysenzeit

zu Kapitel 4.2.1.2:

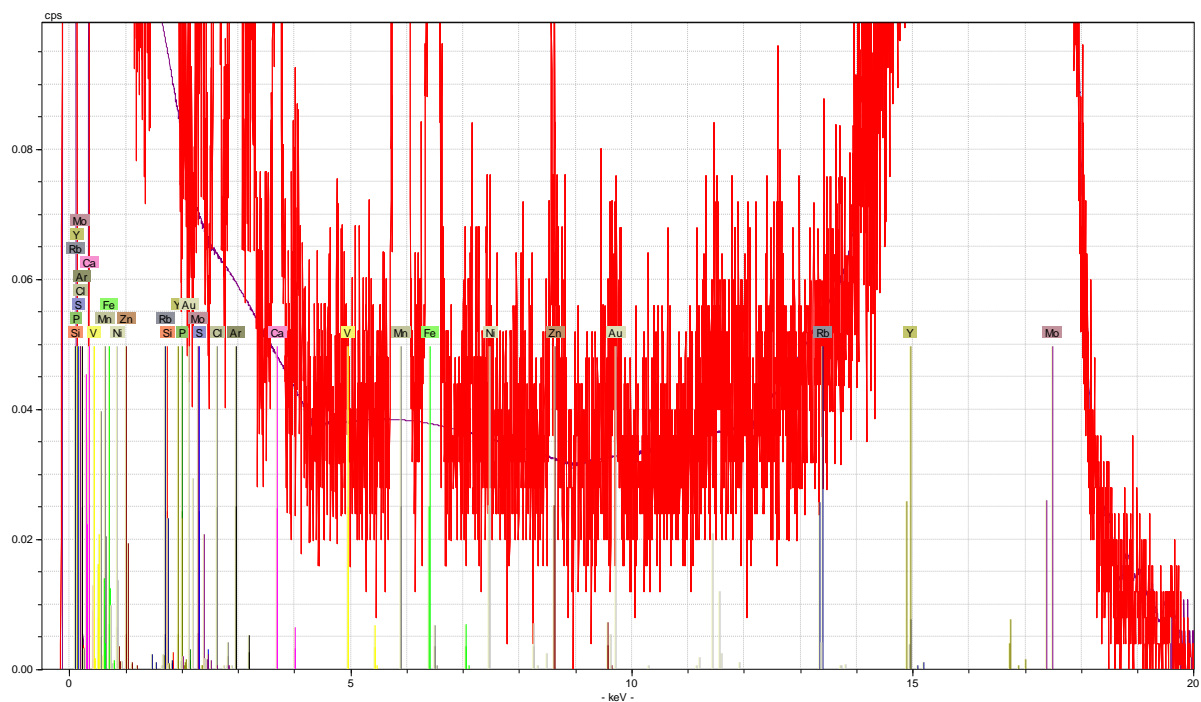


Abb. 7-10 TXRF-Spektrum von 25 ppb Gold-Standardlösung mit 0,4 % PVA, Analysenzeit 250 sec

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] J.C. Touchstone, History of chromatography, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 1647–65
- [2] L.S. Ettre, K.I. Sakodynskii, M. S. Tswett and the discovery of chromatography. I: early work (1899-1903), *Chromatographia* 35 (1993) 223–31
- [3] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases. I. A theory of chromatography. II. Application to the microdetermination of the higher monoamino acids in proteins, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358–68
- [4] J.J. Kirkland, H. L. Pease, Determination of polychlorinated benzoic acid herbicide residues by gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 12 (1964) 468–72
- [5] H.L. Pease, J.J. Kirkland, Determination of methomyl residues using microcoulometric gas chromatography, *J. Agr. Food Chem.* 16 (1968) 554–7
- [6] J.J. Kirkland, Porous thin-layer modified glass bead supports for gas liquid chromatography, *Anal. Chem.* 37 (1965) 1458–61
- [7] J.J. Kirkland, High-performance ultraviolet photometric detector for use with efficient liquid chromatographic columns, *Anal. Chem.* 40 (1968) 391–6
- [8] J.F.K. Huber, J.A.R.J. Hulsman, Liquid chromatography in columns. Time of separation, *Anal. Chim. Acta* 38 (1967) 305–13
- [9] I. Halasz, C. Horvath, Open tube columns with impregnated thin layer support for gas chromatography, *Anal. Chem.* 35 (1963) 499–505
- [10] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 440 f.
- [11] D.S. El, Monolithic Silica for Fast HPLC: Current Success and Promising Future, *Chromatographia* 74 (2011) 681–691
- [12] Y. Wang, F. Ai, S.-C. Ng, T.T.Y. Tan, Sub-2  $\mu\text{m}$  porous silica materials for enhanced separation performance in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 99–109
- [13] S. Fekete, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69 (2012) 9–27
- [14] S. Fekete, E. Olah, J. Fekete, Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 57–71
- [15] M.M. Martin, UHPLC: a giant leap for separation science, *Innovations Pharm. Technol.* 38 (2011) 42, 44-46

- [16] L. Novakova, H. Vlckova, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8–35
- [17] E. Walter, Pharmaökonomische Aspekte von Biosimilars, *Pharmazie in unserer Zeit, Biosimilars*, 41. Jahrgang (2012) 485–491
- [18] BIOTECH100.COM, Pipeline Drugs, 2005, [www.pipelinedrugs.com](http://www.pipelinedrugs.com).
- [19] M. Harris, Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer, *Lancet Oncology* 5 (2004) 292–302
- [20] A. Benjouad, Antibody biotechnology, *African Journal of Biotechnology* 8 (2009) 2911–2915
- [21] M. Tabrizi, G.G. Bornstein, H. Suria, Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease, *AAPS Journal* 12 (2010) 33–43
- [22] Deutscher Apothekerverlag (Hrsg.), *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.): Monoklonale Antikörper für Menschen*, 7. Ausgabe, Grundwerk 2011, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2010
- [23] S. Sydow, K.-H. Grajer, Biosimilars: Die Sicht der Innovatoren: Ähnlich aber nicht gleich, *Pharmazie in unserer Zeit, Biosimilars*, 41. Jahrgang (2012) 474–480
- [24] J.F. Carpenter, T.W. Randolph, W. Jiskoot, D.J.A. Crommelin, C.R. Middaugh, G. Winter, Potential inaccurate quantitation and sizing of protein aggregates by size exclusion chromatography: Essential need to use orthogonal methods to assure the quality of therapeutic protein products, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (2010) 2200–2208
- [25] H.-C. Mahler, W. Friess, U. Grauschopf, S. Kiese, Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98 (2009) 2909–2934
- [26] T. Dingermann, I. Zündorf, Biosimilars: Eine neue Gruppe rekombinanter Arzneimittel: Molekulare Kopien patentfrei gewordener Biologika, *Pharmazie in unserer Zeit, Biosimilars*, 41. Jahrgang (2012) 446–452
- [27] C. Brockmeyer, Die klinische Entwicklung von Biosimilars: Vergleich zu Generika und originalen biopharmazeutischen Arzneimitteln, *Pharmazie in unserer Zeit, Biosimilars*, 41. Jahrgang (2012) 461–467
- [28] A. Koller, H. Wätzig, Precision and variance components in quantitative gel electrophoresis, *Electrophoresis* 26 (2005) 2470–2475

- [29] S. Schröder, H. Zhang, E.S. Yeung, L. Jaensch, C. Zabel, H. Wätzig, Quantitative Gel Electrophoresis: Sources of Variation, *Journal of Proteome Research* 7 (2008) 1226–1234
- [30] J. Norrgran, T.L. Williams, A.R. Woolfitt, M.I. Solano, J.L. Pirkle, J.R. Barr, Optimization of digestion parameters for protein quantification, *Analytical Biochemistry* 393 (2009) 48–55
- [31] J.C. Silva, M.V. Gorenstein, G.-Z. Li, J.P.C. Vissers, S.J. Geromanos, Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition, *Molecular & cellular proteomics MCP* 5 (2006) 144–156
- [32] W. Miehle, H.J. Albrecht, *Rheumatologie in Praxis und Klinik: 631 Tabellen*, 2. Auflage, Seite 542 ff., Thieme, Stuttgart, 2000
- [33] M. Galanski, B.K. Keppler, Tumorhemmende Metallverbindungen: Entwicklung, Bedeutung und Perspektiven, *Pharmazie in unserer Zeit, Alkylanzien/Metallkomplexe* 35. Jahrgang (2006) 118–123
- [34] G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, Organometallic anticancer compounds, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 3–25
- [35] European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM) (Hrsg.), *Metal catalysts or metal reagents: procedures (2.4.20): Group HM (Heavy Metals)*, 2011
- [36] H. Aiginger, P. Wobrauschek, Method for quantitative x-ray fluorescence analysis in the nanogram region, *Nucl. Instrum. Methods* 114 (1974) 157–8
- [37] R. Klockenkämper, *Total reflection X-ray fluorescence analysis*, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 2
- [38] H. Aiginger, Historical development and principles of total reflection x-ray fluorescence analysis (TXRF), *Spectrochim. Acta, Part B* 46 (1991) 1313–21
- [39] Y. Yoneda, T. Horiuchi, Optical flats for use in x-ray spectrochemical microanalysis, *Rev. Sci. Instrum.* 42 (1971) 1069–70
- [40] C. Strelt, Development of total reflection x-ray fluorescence analysis at the Atominsitute of the Austrian universities, *X-Ray Spectrom.* 29 (2000) 203–211
- [41] A. von Bohlen, Total reflection X-ray fluorescence and grazing incidence X-ray spectrometry - Tools for micro- and surface analysis. A review, *Spectrochim. Acta, Part B* 64 (2009) 821–832
- [42] P. Wobrauschek, Total reflection X-ray fluorescence analysis-a review, *X-Ray Spectrom.* 36 (2007) 289–300

- [43] R. Klockenkaemper, A. von Bohlen, Elemental analysis of environmental samples by total reflection X-ray fluorescence. A review, *X-Ray Spectrometry* 25 (1996) 156–162
- [44] M. Mertens, C. Rittmeyer, B.O. Kolbesen, Evaluation of the protein concentration in enzymes via determination of sulfur by total reflection X-ray fluorescence spectrometry - limitations of the method, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56 (2001) 2157–2164
- [45] Z. Polgari, Z. Ajtony, P. Kregsamer, C. Strelly, V.G. Mihucz, A. Reti, B. Budai, J. Kralovanszky, N. Szoboszlai, G. Zaray, Microanalytical method development for Fe, Cu and Zn determination in colorectal cancer cells, *Talanta* 85 (2011) 1959–1965
- [46] L. Borgese, A. Zacco, E. Bontempi, M. Pellegatta, L. Vigna, L. Patrini, L. Riboldi, F.M. Rubino, L.E. Depero, Use of total reflection X-ray fluorescence (TXRF) for the evaluation of heavy metal poisoning due to the improper use of a traditional ayurvedic drug, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 787–790
- [47] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 444
- [48] Essex Scientific Laboratory Supplies Ltd, SCAT Safety System, 2013
- [49] Hitachi High-Technologies Corporation, Instruction Manual Degasser built in Model L-2100/2130/2160U Pump, 5th Edition ed., Tokyo, 2010
- [50] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 445 f.
- [51] V.R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 65 f.
- [52] V.R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 55 f.
- [53] V.R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 70 ff.
- [54] V.R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 108
- [55] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 448 f.
- [56] K. Nakanishi, N. Soga, Phase separation in gelling silica-organic polymer solution: systems containing poly(sodium styrenesulfonate), *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 2518–30

- [57] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 115 f.
- [58] S.K.H. El Deeb, High Efficiency Separation Techniques: Fast HPLC Using Monolithic Silica Columns and Chiral Separation Using Capillary Zone Electrophoresis, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, 2007
- [59] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 110 f.
- [60] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 451 f.
- [61] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 89 ff.
- [62] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 98 ff.
- [63] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 85
- [64] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 442
- [65] C.T. Mant, R.S. Hodges, High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analysis, and conformation, CRC Press, Boca Raton, 1991, Seite 69 ff.
- [66] M.T.W. Hearn, The High performance liquid chromatography of peptides, proteins, and polynucleotides, VCH, 1991, Seite 11 ff.
- [67] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 147
- [68] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 149 f. und 78
- [69] C.T. Mant, R.S. Hodges, High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analysis and conformation, 16, CRC Press, Boca Raton, 1991
- [70] GE Healthcare Bio-Sciences AB, Hydrophobic Interaction Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography: Principles and Methods, 2006, [www.gehealthcare.com/protein-purification](http://www.gehealthcare.com/protein-purification)
- [71] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 198 f.

- [72] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 459 ff.
- [73] F. Bracher, P. Heisig, P. Langguth, E. Mutschler, G. Rücker, G. Scriba, E. Stahl-Biskup, R. Troschütz, G. Seitz (Hrsg.), Arzneibuch-Kommentar, 44. Auflage, Wiss. Verl.-Ges. Stuttgart; Govi Verlag, Eschborn, 2013
- [74] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 210 ff.
- [75] C. Wang, L. Wang, X. Geng, High Recovery Refolding of rhG-CSF from *Escherichia coli*, Using Urea Gradient Size Exclusion Chromatography, *Biotechnol. Prog.* 24 (2008) 209–213
- [76] F. Gao, L. Shi, L.-X. Xu, Refolding of recombinant human interferon  $\alpha$ -2a from *Escherichia coli* by urea gradient size exclusion chromatography, *Appl. Biochem. Microbiol.* 49 (2013) 11–17
- [77] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 184 f.
- [78] Amersham Biosciences, R. Jansson, Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods, 2004, <http://www.immun.lth.se/uploads/media/IEX.pdf>, accessed 23 July 2010, Seite 34 ff.
- [79] Amersham Biosciences, R. Jansson, Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods, 2004, <http://www.immun.lth.se/uploads/media/IEX.pdf>, accessed 23 July 2010, Seite 36 f.
- [80] Deutscher Apothekerverlag (Hrsg.), European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 7. Ausgabe, Grundwerk 2011, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2010
- [81] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 23 f.
- [82] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 394
- [83] Deutscher Apothekerverlag (Hrsg.), European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 7. Ausgabe, Grundwerk 2011, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2010, Kapitel 2.2.46
- [84] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 396 f.
- [85] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 398 f.

- [86] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 21
- [87] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 403 f.
- [88] T. Kreutzig, Biochemie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1 mit Einarbeitung der wichtigen Prüfungsfakten, 9. Auflage, G. Fischer, Lübeck, Stuttgart, Jena, Ulm, 1997, Seite 24 f.
- [89] G. Löffler, Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer, Heidelberg, 2007, Seite 56 ff.
- [90] H. Schellekens, Follow-on biologics: challenges of the "next generation", Nephrol Dial Transplant 20 Suppl 4 (2005) iv31-36
- [91] C.T. Mant, R.S. Hodges, High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analysis and conformation, CRC Press, Boca Raton, 1991, Seite 5
- [92] I. Krämer, W. Jelkmann, Rekombinante Arzneimittel: Medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, Seite 3
- [93] G. Löffler, Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Abb. 2.28, Springer, Heidelberg, 2007, Seite 46
- [94] G. Löffler, Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Abb. 2.27, Springer, Heidelberg, 2007, Seite 45
- [95] G. Löffler, Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer, Heidelberg, 2007, Seite 77 ff.
- [96] I. Krämer, W. Jelkmann, Rekombinante Arzneimittel: Medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie, 2. Auflage, Abb. 1.3 Seite 4, Abb. 1.4, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, Seite 3
- [97] I. Krämer, W. Jelkmann, Rekombinante Arzneimittel: Medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, Seite 5
- [98] W.J. Thieman, M.A. Palladino, N.W. Hopf, Biotechnologie, Pearson Studium, München, 2007, Seite 126
- [99] X. Pan, S. Yu, P. Yao, Z. Shao, Self-assembly of  $\beta$ -casein and lysozyme, J. Colloid Interface Sci. 316 (2007) 405–412



- [100] A.C. Dumetz, A.M. Snellinger-O'Brien, E.W. Kaler, A.M. Lenhoff, Patterns of protein-protein interactions in salt solutions and implications for protein crystallization, *Protein Science* 16 (2007) 1867–1877
- [101] H. Gochman-Hecht, H. Bianco-Peled, Structure modifications of AOT reverse micelles due to protein incorporation, *J. Colloid Interface Sci* 297 (2006) 276–283
- [102] J. Rassow, *Biochemie: 50 Tabellen*, Thieme, Stuttgart, 2006, Seite 702 f.
- [103] M.T.W. Hearn, *The High performance liquid chromatography of peptides, proteins, and polynucleotides*, VCH, 1991, Seite 600 f.
- [104] E. Teuscher, U. Lindequist, M.F. Melzig, *Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*, 6. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2004, Seite 742 f.
- [105] E. Teuscher, U. Lindequist, M.F. Melzig, *Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*, 6. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2004, Seite 742 Abb. 35-1
- [106] J. Rassow, *Biochemie*, Thieme, Stuttgart, 2006, Seite 707, Abb. 26.13
- [107] E. Teuscher, U. Lindequist, M.F. Melzig, *Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*, 6. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2004, Seite 743; Tab. 35-1
- [108] G. Löffler, *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer, Heidelberg, 2007, Seite 1118
- [109] G. Löffler, *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer, Heidelberg, 2007, Seite 1105 ff.
- [110] J. Rassow, *Biochemie*, Thieme, Stuttgart, 2006, Seite 701 ff.
- [111] WHO - World Health Organization, WHO Drug Information, 2009, [http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/issues/DrugInfo09\\_Vol23-3.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/issues/DrugInfo09_Vol23-3.pdf)
- [112] E. Teuscher, U. Lindequist, M.F. Melzig, *Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*, 6. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2004, Seite 745 ff.
- [113] Paul-Ehrlich-Institut, *Monoklonale Antikörper*, 2013, <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/immunglobuline-monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html>
- [114] Rote Liste, Humira, 2013, <http://www.rote-liste.de/Online/jumpsearch>

- [115] I. Krämer, W. Jelkmann, Rekombinante Arzneimittel: Medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, Seite 6
- [116] E. Teuscher, U. Lindequist, M.F. Melzig, Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie, 6. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2004, Seite 746 ff.
- [117] W.J. Thieman, M.A. Palladino, N.W. Hopf, Biotechnologie, Pearson Studium, München, 2007, Seite 326
- [118] G. Löffler, Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer, Heidelberg, 2007, Seite 1127 f.
- [119] D.P. Clark, N.J. Pazdernik, Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen, Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg, 2009, Seite 174 ff.
- [120] J.R. Birch, E.S. Lennox, Monoclonal antibodies: Principles and applications, The production of monoclonal antibodies, Wiley-Liss, New York, 1995, Seite 232 f.
- [121] R. Klockenkämper, A. von Bohlen, Total-reflection X-ray fluorescence moving towards nanoanalysis: a survey, Spectrochim. Acta, Part B 56 (2001) 2005–2018
- [122] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 66 f.
- [123] B. Beckhoff, Handbook of practical X-ray fluorescence analysis, Springer, Berlin, New York, 2006, Seite 498 ff.
- [124] Bruker Nano GmbH, S2 Picofox, 2013, [http://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/X-rayDiffraction\\_ElementalAnalysis/TXRF/Brochures/bro\\_s2\\_picofox\\_de\\_rev3-1\\_lowres.pdf](http://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/X-rayDiffraction_ElementalAnalysis/TXRF/Brochures/bro_s2_picofox_de_rev3-1_lowres.pdf)
- [125] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 5 ff.
- [126] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Abb. 20
- [127] D. Winklmaier, Röntgenspektrometrie: Skript zum Praktikum Instrumentelle Analytik SS 2009, 2009, <http://www.winklmaier.de/ianSS09/Folien/Roentgenspektrometrie.pdf>
- [128] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 25 ff.
- [129] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997 Seite 29 ff.

- [130] P. Wobrauschek, H. Aiginger, Total-reflection x-ray fluorescence spectrometric determination of elements in nanogram amounts, *Anal. Chem.* 47 (1975) 852–5
- [131] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 63 f.
- [132] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 31, Tabelle 1-3
- [133] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 33 ff.
- [134] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 35 ff.
- [135] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997
- [136] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 91 ff.
- [137] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 34 f.
- [138] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 92, Abb. 3-2
- [139] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 93 f.
- [140] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 36 f.
- [141] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 94 ff.
- [142] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 90
- [143] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 48 f.
- [144] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 101, Tabelle 3-1
- [145] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 53

- [146] D. Winklmaier, Röntgenspektrometrie: Skript zum Praktikum Instrumentelle Analytik SS 2009, 2009, <http://www.winklmaier.de/ianSS09/Folien/Roentgenspektrometrie.pdf>
- [147] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 45 f.
- [148] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 103
- [149] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 89 f.
- [150] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 106 ff.
- [151] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 108, Abb. 3-9
- [152] D. Winklmaier, Röntgenspektrometrie: Skript zum Praktikum Instrumentelle Analytik SS 2009, 2009, <http://www.winklmaier.de/ianSS09/Folien/Roentgenspektrometrie.pdf>
- [153] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 38 f.
- [154] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 68 f.
- [155] R. Klockenkämper, Total reflection X-ray fluorescence analysis, 140, Wiley, New York, 1997, Seite 154
- [156] ICH Expert Working Group, ICH Official website, 2012, [www.ich.org](http://www.ich.org)
- [157] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1): Current Step 4 version Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005), 27 October 1994
- [158] J. Limberg, Analytische Validierung - Ein Überblick über die Anforderungen, Pharm. Ind. 74 (2012) 138–144
- [159] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2011, Seite 119 f.
- [160] J. Vessman, Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 867–869

- [161] J. Ermer, J.H.M. Miller, Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, Seite 80
- [162] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2011, Seite 201
- [163] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 198 f.
- [164] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2011, Seite 189
- [165] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2011, Seite 47
- [166] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 14 f.
- [167] J. Hartung, B. Elpelt, K.-H. Klösener, Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik ; mit zahlreichen, vollständig durchgerechneten Beispielen, 14. Auflage, Oldenbourg, München, Wien, 2005, Seite 116 f.
- [168] H. Wätzig, W. Mehnert, W. Bühler, Mathematik und Statistik kompakt: Grundlagen und Anwendungen in Pharmazie und Medizin, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2009, Seite 86
- [169] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2011, Seite 54
- [170] H. Wätzig, W. Mehnert, W. Bühler, Mathematik und Statistik kompakt: Grundlagen und Anwendungen in Pharmazie und Medizin, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2009, Seite 108 f.
- [171] J. Ermer, J.H.M. Miller, Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, Seite 30
- [172] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2011, Seite 50
- [173] L. Kaminski, M. Degenhardt, J. Ermer, C. Feussner, H. Hoewer-Fritzen, P. Link, B. Renger, M. Tegtmeier, H. Wätzig, Efficient and economic HPLC performance qualification, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51 (2010) 557–564
- [174] X. Deng, S. Schröder, S. Redweik, H. Wätzig, Quantitative gel electrophoresis: New records in precision by elaborated staining and detection protocols, Electrophoresis 32 (2011) 1667–1674
- [175] U.S. Food and Drug Administration (Ed.), USP 36 - NF31, 2013

- [176] J. Ermer, J.H.M. Miller, Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, Seite 108
- [177] J. Ermer, J.H.M. Miller, Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, Seite 118
- [178] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2011, Seite 111 f.
- [179] J. Ermer, J.H.M. Miller, Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice, Wiley-VCH, Weinheim, 2005, Seite 124 f.
- [180] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2011, Seite 203
- [181] N.C. Nicolaides, P.M. Sass, L. Grasso, Monoclonal antibodies: a morphing landscape for therapeutics, Drug Development Research 67 (2006) 781–789
- [182] I. Rais, Anforderungen an Entwicklung und Qualität von Biosimilars: Wenn zwei das gleiche tun, ist es nicht dasselbe, Pharmazie in unserer Zeit, Biosimilars, 41. Jahrgang (2012) 453–460
- [183] L. Kaminski, Aspekte des wirtschaftlichen und effizienten Einsatzes der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, 2011
- [184] G. Vanecek, F.E. Regnier, Variables in the high-performance anion-exchange chromatography of proteins, Analytical Biochemistry 109 (1980) 345–353
- [185] F.E. Regnier, High-performance ion-exchange chromatography of proteins: the current status, High-Perform. Liq. Chromatogr. Proteins Pept., Proc. Int. Symp., 1st, Analytical Biochemistry (1982) 1–7
- [186] W. Kopaciewicz, M.A. Rounds, F.E. Regnier, Stationary phase contributions to retention in high-performance anion-exchange protein chromatography: ligand density and mixed mode effects, Journal of Chromatography 318 (1985) 157–172
- [187] S. Eeltink, S. Dolman, F. Detobel, G. Desmet, R. Swart, M. Ursem, 1 mm ID poly(styrene-co-divinylbenzene) monolithic columns for high-peak capacity one- and two-dimensional liquid chromatographic separations of intact proteins, Journal of Separation Science 32 (2009) 2504–2509
- [188] D. Josic, J.G. Clifton, Use of monolithic supports in proteomics technology, Journal of Chromatography, A 1144 (2007) 2–13

- [189] P.A. Levkin, S. Eeltink, T.R. Stratton, R. Brennen, K. Robotti, H. Yin, K. Killeen, F. Svec, J.M.J. Frechet, Monolithic porous polymer stationary phases in polyimide chips for the fast high-performance liquid chromatography separation of proteins and peptides, *Journal of Chromatography, A* 1200 (2008) 55–61
- [190] G.A. Tishchenko, M. Bleha, J. Skvor, T. Bostik, Effect of salt concentration gradient on separation of different types of specific immunoglobulins by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose, *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* 706 (1998) 157–166
- [191] D.M. Strauss, J. Gorrell, M. Plancarte, G.S. Blank, Q. Chen, B. Yang, Anion exchange chromatography provides a robust, predictable process to ensure viral safety of biotechnology products, *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 168–175
- [192] D. Corporation, Product Manual for ProSwift Monolithic Columns SAX-1S WAX-1S WCX-1S SCX-1S, 2008, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/38386-Man-065122-06-ProSwift-Mono-AX-CX-Mar10.pdf>, accessed 23 July 2010, Seite 44 f.
- [193] Deutscher Apothekerverlag (Hrsg.), *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)*, 7. Ausgabe, Grundwerk 2011, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2010
- [194] J.R. Deschamps, J.E. Hildreth, D. Derr, J.T. August, A high-performance liquid chromatographic procedure for the purification of mouse monoclonal antibodies, *Anal. Biochem.* 147 (1985) 451–4
- [195] G. Teshima, M.-X. Li, R. Danishmand, C. Obi, R. To, C. Huang, J. Kung, V. Lahidji, J. Freeberg, L. Thorner, M. Tomic, Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange, *J. Chromatogr., A* 1218 (2011) 2091–2097
- [196] Amersham Biosciences, R. Jansson, *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods*, 2004, <http://www.immun.lth.se/uploads/media/IEX.pdf>, accessed 23 July 2010, Seite 34 f.
- [197] D. Corporation, Product Manual for ProSwift Monolithic Columns SAX-1S WAX-1S WCX-1S SCX-1S, 2008, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/38386-Man-065122-06-ProSwift-Mono-AX-CX-Mar10.pdf>, accessed 23 July 2010, Seite 28 und 30
- [198] Amersham Biosciences, R. Jansson, *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods*, 2004, <http://www.immun.lth.se/uploads/media/IEX.pdf>, accessed 23 July 2010, Seite 160
- [199] T.P. Bradshaw, *A User's Guide: Introduction to Peptide and Protein HPLC*, 1998-2006, [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com), Seite 26
- [200] Sigma-Aldrich Co. LLC., *Trizma® base*, 2013, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1503?lang=de&region=DE>

- [201] M.D. Bond, M.E. Panek, Z. Zhang, D. Wang, P. Mehndritta, H. Zhao, K. Gunton, A. Ni, M.L. Nedved, S. Burman, et al, Evaluation of a Dual-Wavelength Size Exclusion HPLC Method With Improved Sensitivity to Detect Protein Aggregates and Its Use to Better Characterize Degradation Pathways of an IgG1 Monoclonal Antibody, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (2010) 2582–2597
- [202] A. Diress, B. Lorbetskie, L. Larocque, X. Li, M. Alteen, R. Isbrucker, M. Girard, Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays, *J. Chromatogr., A* 1217 (2010) 3297–3306
- [203] A. Eppler, M. Weigandt, A. Hanefeld, H. Bunjes, Relevant shaking stress conditions for antibody preformulation development, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74 (2010) 139–47
- [204] M. Printz, W. Friess, Simultaneous detection and analysis of protein aggregation and protein unfolding by size exclusion chromatography with post column addition of the fluorescent dye BisANS, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 826–837
- [205] H. Hughes, C. Morgan, E. Brunyak, K. Barranco, E. Cohen, T. Edmunds, K. Lee, A multi-tiered analytical approach for the analysis and quantitation of high-molecular-weight aggregates in a recombinant therapeutic glycoprotein, *AAPS J.* 11 (2009) 335–341
- [206] W. Kopaciewicz, F.E. Regnier, Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: effects of pH at low ionic strength, *High-Perform. Liq. Chromatogr. Proteins Pept., Proc. Int. Symp., 1st, Analytical Biochemistry* (1982) 8–16
- [207] Phenomenex, BioSep-Columns for Gel Filtration Chromatography: High Performance Size Exclusion for Biomolecules, 2010, <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/7b9fe422-933e-48df-a189-373e2ef59503.pdf>, accessed 9 February 2012, Seite 18
- [208] PSS Polymer Standards Service GmbH, Specifications PROTEEMA columns, <http://www.polymer.de/products/columns-for-gpcsecgfc/proteema.html>
- [209] I. Guelseren, D. Guezey, B.D. Bruce, J. Weiss, Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions, *Ultrason. Sonochem.* 14 (2006) 173–183
- [210] T. Rakow, Probenvorbereitung für die Proteinanalytik mit der HPLC, Dissertation in Vorbereitung, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig
- [211] H. Egermann, K.H. Bauer, B.C. Lippold, *Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie: Mit einer Einführung in die Biopharmazie*, 8. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2006



- [212] J. Heukeshoven, R. Dernick, Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 326 (1985) 91–101
- [213] B. Michov, *Elektrophorese: Theorie und Praxis*, W. de Gruyter, Berlin, New York, 1996
- [214] S.M. Bhairi, *Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems*, 2001,  
[http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/detergents/calbiochem\\_detergents.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/detergents/calbiochem_detergents.pdf)
- [215] M.F. Borgerding, W.L. Hinze, Characterization and evaluation of the use of nonionic polyoxyethylene(23)dodecanol micellar mobile phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2183–90
- [216] J.S. Landy, J.G. Dorsey, Characterization of micellar mobile phases for reversed-phase chromatography, *Anal. Chim. Acta* 178 (1985) 179–88
- [217] R.A. Barford, B.J. Sliwinski, Micellar chromatography of proteins, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1554–6
- [218] S. Wroblewitz, *Leistungsfähigkeit neuer chromatographischer Methoden in der Proteinanalytik*, Diplomarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, 2011
- [219] PubChem, Sodium Dodecyl Sulfate - Compound Summary,  
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3423265>
- [220] Phenomenex, *BioSep-Columns for Gel Filtration Chromatography: High Performance Size Exclusion for Biomolecules*, 2010,  
<https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/7b9fe422-933e-48df-a189-373e2ef59503.pdf>, accessed 9 February 2012, Seite 18 f.
- [221] Phenomenex, *BioSep-Columns for Gel Filtration Chromatography: High Performance Size Exclusion for Biomolecules*, 2010,  
<https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/7b9fe422-933e-48df-a189-373e2ef59503.pdf>, accessed 9 February 2012, Seite 13, Human IgG2k Aggregates
- [222] J.R. Birch, E.S. Lennox, *Monoclonal antibodies: Principles and applications*, Wiley-Liss, New York, 1995
- [223] R.J. Harris, B. Kabakoff, F.D. Macchi, F.J. Shen, M. Kwong, J.D. Andya, S.J. Shire, N. Bjork, K. Totpal, A.B. Chen, Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody, *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* 752 (2001) 233–245
- [224] C. Meyer, P. Seiler, C. Bies, C. Cianciulli, H. Wätzig, V.R. Meyer, Minimum required signal-to-noise ratio for optimal precision in HPLC and CEC, *Electrophoresis* 33 (2012) 1509–1516

- [225] S. Grotefend, L. Kaminski, S. Wroblewitz, D.S. El, N. Kühn, S. Reichl, M. Limberger, S. Watt, H. Wätzig, Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71 (2012) 127–138
- [226] C.A. Frolík, L.L. Dart, M.B. Sporn (Eds.), Variables in the high-pressure cation-exchange chromatography of proteins, *High-Perform. Liq. Chromatogr. Proteins Pept., Proc. Int. Symp.*, 1st, Academic, 1983
- [227] K.M. Gooding, M.N. Schmuck, Ion selectivity in the high-performance cation-exchange chromatography of proteins, *Journal of Chromatography* 296 (1984) 321–328
- [228] S. Gupta, E. Pfannkoch, F.E. Regnier, High-performance cation-exchange chromatography of proteins, *Analytical Biochemistry* 128 (1983) 196–201
- [229] Jens Ohnesorge, HPLC-Säulen zur Proteintrennung, E-Mail, 2010
- [230] S. Rao, C. Pohl, Reversible interference of Fe<sup>3+</sup> with monoclonal antibody analysis in cation exchange columns, *Anal. Biochem* 409 (2011) 293–295
- [231] J.C. Rea, G.T. Moreno, Y. Lou, D. Farnan, Validation of a pH gradient-based ion-exchange chromatography method for high-resolution monoclonal antibody charge variant separations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54 (2011) 317–323
- [232] D. Corporation, Product Manual for ProPac WCX-10 and SCX-10, 2007, Seite 30
- [233] D. Corporation, Product Manual for ProPac WCX-10 and SCX-10, 2007, Seite 3
- [234] Amersham Biosciences, R. Jansson, Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods, 2004, <http://www.immun.lth.se/uploads/media/IEX.pdf>, accessed 23 July 2010, Seite 13
- [235] H. Dibbern, UV and IR Spectra of some important drugs, Editio Cantor, Avlendorf, 1978, Spektrum 3074
- [236] D. Corporation, Product Manual for ProPac WCX-10 and SCX-10, 2007, Seite 4
- [237] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 9. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, Seite 187
- [238] K.P.C. Vollhardt, Organische Chemie, 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, Seite 900
- [239] C.T. Mant, R.S. Hodges, High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analysis and conformation, CRC Press, Boca Raton, 1991, Seite 173

- [240] T. Ikegami, K. Horie, J. Jaafar, K. Hosoya, N. Tanaka, Preparation of highly efficient monolithic silica capillary columns for the separations in weak cation-exchange and HILIC modes, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 31–37
- [241] E.Y. Chi, S. Krishnan, T.W. Randolph, J.F. Carpenter, Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1325–1336
- [242] D. Corporation, Monitoring Protein Deamidation by Cation-Exchange Chromatography, 2009, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4458-AN125-Cation-Exchange-26Jun09-LPN1045-02.pdf>, accessed 9 May 2012
- [243] H. Lau, D. Pace, B. Yan, T. McGrath, S. Smallwood, K. Patel, J. Park, S.S. Park, R.F. Latypov, Investigation of degradation processes in IgG1 monoclonal antibodies by limited proteolysis coupled with weak cation-exchange HPLC, *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878 (2010) 868–876
- [244] M. Weitzhandler, D. Farnan, J.S. Rohrer, N. Avdalovic, Protein variant separations using cation exchange chromatography on grafted, polymeric stationary phases, *Proteomics* 1 (2001) 179–185
- [245] D. Corporation, Monitoring Monoclonal Antibody Heterogeneity by Cation-Exchange Chromatography, 2009, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4470-AN127-Cation-Exchange-Chromatography-02Feb09-LPN1047-01.pdf>, accessed 9 May 2012
- [246] D. Corporation, Product Manual for ProPac WCX-10 and SCX-10, 2007, Seite 21
- [247] D. Corporation, Product Manual for ProPac WCX-10 and SCX-10, 2007, Seite 11
- [248] Michael Weitzhandler, Protein variant separations by cation-exchange chromatography on tentacle-type polymeric stationary phases, *Journal of Chromatography A* 828 (1998) 365–372
- [249] R.J. Harris, Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture, *J. Chromatogr., A* 705 (1995) 129–34
- [250] J.E. Folk, K.A. Piez, W.R. Carroll, J.A. Gladner, Carboxypeptidase B. IV. Purification and characterization of the porcine enzyme, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 2272–7
- [251] Worthington Biochemical Corporation, Carboxypeptidase B: Worthington Enzyme Manual, 2012, <http://www.worthington-biochem.com/COB/default.html>
- [252] University of Maine, Department of Chemistry, Carboxypeptidase B, <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase8a.html>
- [253] Roche Diagnostics, Carboxypeptidase B: Product Catalog, 1996-2011, [http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3\\_1\\_3\\_2\\_3\\_1.html](http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3_1_3_2_3_1.html)

- [254] L. Melter, G. Stroehlein, A. Butte, M. Morbidelli, Adsorption of monoclonal antibody variants on analytical cation-exchange resin, *J. Chromatogr., A* 1154 (2007) 121–131
- [255] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, D. Faldu, C. Chumsae, J. Sun, Heterogeneity of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2426–2447
- [256] R.M. Bartholomew, T.C. Furman, R.A. Jue, J.P. McDonough, EP361902A2, 1990
- [257] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 3. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2001, Seite 434 f.
- [258] S. Kromidas, *Validierung in der Analytik*, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2011, Seite 240 ff.
- [259] P. Hasemann, M. ter Balk, H. Wätzig, Analysis of substances to be used as internal standards in MEKC, *Electrophoresis* 28 (2007) 1798–1804
- [260] U. Schepers, J. Ermer, L. Preu, H. Wätzig, Wide concentration range investigation of recovery, precision and error structure in liquid chromatography, *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 810 (2004) 111–118
- [261] M. Stastna, E.J.E. Van, Analysis of protein isoforms: Can we do it better?, *Proteomics* 12 (2012) 2937–2948
- [262] J.D. Tipton, J.C. Tran, A.D. Catherman, D.R. Ahlf, K.R. Durbin, N.L. Kelleher, Analysis of Intact Protein Isoforms by Mass Spectrometry, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 25451–25458
- [263] P. Petersson, A. Frank, J. Heaton, M.R. Euerby, Maximizing peak capacity and separation speed in liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2346–2357
- [264] Chromatography Online, Capillary Electrophoresis, 2012, <http://license.icopyright.net/user/viewFreeUse.act?fuid=MTcwNjQwMzM%3D>
- [265] M.T.W. Hearn, *The High performance liquid chromatography of peptides, proteins, and polynucleotides*, VCH, 1991, Seite 742
- [266] P. Luraschi, S. Brambilla, I. Infusino, C. Franzini, Precision and long-term stability of capillary electrophoresis measurement of serum protein zones, *Clin. Chim. Acta* 333 (2003) 41–5
- [267] X. Bossuyt, Advances in serum protein electrophoresis, *Adv. Clin. Chem.* 42 (2006) 43–80
- [268] A. Suratman, H. Wätzig, Reproducible protein analysis by CE using linear polyacrylamide-coated capillaries and hydrochloric acid rinsing, *Electrophoresis* 28 (2007) 2324–2328

- [269] A. Suratman, H. Wätzig, Long-term precision in capillary isoelectric focusing for protein analysis, *Journal of Separation Science* 31 (2008) 1834–1840
- [270] J.C. Nishihara, K.M. Champion, Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain, *Electrophoresis* 23 (2002) 2203–2215
- [271] S. Schröder, A. Brandmueller, X. Deng, A. Ahmed, H. Wätzig, Improving precision in gel electrophoresis by stepwisely decreasing variance components, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50 (2009) 320–327
- [272] X. Deng, T. Hahne, S. Schröder, S. Redweik, D. Nebija, H. Schmidt, O. Janssen, B. Lachmann, H. Wätzig, The challenge to quantify proteins with charge trains due to isoforms or conformers, *Electrophoresis* 33 (2012) 263–269
- [273] S. Schröder, Präzision in der Gelelektrophorese für die Pharmazeutische Qualitätskontrolle, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, 2009
- [274] X. Deng, Optimierung der quantitativen Gelelektrophorese für die pharmazeutische Analytik, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, 2012
- [275] C. Cianciulli, T. Hahne, H. Wätzig, Capillary gel electrophoresis for precise protein quantitation, *Electrophoresis* 33 (2012) 3276–3280
- [276] I. Gaillard, A. Martial, A. Marc, J.-M. Engasser, M. Fick, Analytical method optimization for protein determination by fast high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr., A* 679 (1994) 261–8
- [277] D.K. Lloyd, H. Wätzig, Sodium dodecyl sulfate solution is an effective between-run rinse for capillary electrophoresis of samples in biological matrixes, *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 663 (1995) 400–5
- [278] D. El-Hady, S. Kuehne, N. El-Maali, H. Wätzig, Precision in affinity capillary electrophoresis for drug-protein binding studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 232–241
- [279] M. Graf, H. Wätzig, Capillary isoelectric focusing - reproducibility and protein adsorption, *Electrophoresis* 25 (2004) 2959–2964
- [280] W. Voigt, A. Dietrich, H.-J. Schmoll, Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz, *Pharmazie in unserer Zeit, Alkylanzien/Metallkomplexe* 35. Jahrgang (2006) 134–143
- [281] I. Ott, On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1670–1681

- [282] A. Meyer, S. Grotefend, A. Gross, H. Wätzig, I. Ott, Total reflection X-ray fluorescence spectrometry as a tool for the quantification of gold and platinum metallodrugs: Determination of recovery rates and precision in the ppb concentration range, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012) 713–717
- [283] A. Meyer, Dissertation in Vorbereitung, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig
- [284] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 51 f.
- [285] PubChem, Auranofin - Compound Summary, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6333901>
- [286] A. Albert, C. Brauckmann, F. Blaske, M. Sperling, C. Engelhard, U. Karst, Speciation analysis of the antirheumatic agent Auranofin and its thiol adducts by LC/ESI-MS and LC/ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 975–981
- [287] Academic, Auranofin, 2000-2010, <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/114522>
- [288] M. Mertens, Schwefel-Bestimmung in Proteinen und Enzymen mit der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) - Möglichkeiten und Grenzen -, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, Frankfurt am Main, 2002
- [289] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 58 f.
- [290] B. Beckhoff, Handbook of practical X-ray fluorescence analysis, Springer, Berlin, New York, 2006, Seite 493 ff.
- [291] J. Knoth, H. Schwenke, An x-ray fluorescence spectrometer with totally reflecting sample support for trace analysis at the ppb level, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 291 (1978) 200–4
- [292] A. Gross, PVA-Zusatz, persönliches Gespräch, Braunschweig, 2011
- [293] H. Wätzig, W. Mehnert, W. Bühler, Mathematik und Statistik kompakt: Grundlagen und Anwendungen in Pharmazie und Medizin, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2009, Seite 202 f.
- [294] H. Wätzig, W. Mehnert, W. Bühler, Mathematik und Statistik kompakt: Grundlagen und Anwendungen in Pharmazie und Medizin, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 2009, Seite 205 ff.
- [295] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch, Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008, Seite 71 f.

- [296] H.J. Sanchez, Detection limit calculations for the total reflection techniques of X-ray fluorescence analysis, *Spectrochim. Acta, Part B* 56 (2001) 2027–2036
- [297] R.L. Plackett, J.P. Burman, The Design of Optimum Multifactorial Experiments, *Biometrika* 33 (1946) 305–325
- [298] D. Corporation, Product Manual for ProSwift Monolithic Columns SAX-1S WAX-1S WCX-1S SCX-1S, 2008, <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/38386-Man-065122-06-ProSwift-Mono-AX-CX-Mar10.pdf>, accessed 23 July 2010
- [299] D. Corporation, Product Manual for ProPac WCX-10 and SCX-10, 2007
- [300] J. Weiß, Ionenchromatographie, 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 2001
- [301] Bruker AXS Microanalysis GmbH, S2 Picofox Nutzerhandbuch Dokument: DOC-M81-DXX001 V1, 2008

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1 verwendete HPLC-Geräte; links: MERCK® Hitachi® HPLC-Anlage, rechts: VWR-Hitachi® HPLC-Anlage.....	4
Abb. 2-2 schematischer HPLC-Aufbau; 1) Elutionsmittel, 2) integrierter Entgaser, 3) Gradientenmischer, 4) Pumpe, 5) Spülventil, 6) Injektor, 7) Dosierschleife, 8) Trennsäule, 9) Detektor, 10) Abfallgefäß, 11) PC mit Datenauswertung; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® 5	5
Abb. 2-3 eingesetzte HPLC-Trennsäulen; von oben nach unten: Phenomenex Größenausschluss-Säule mit Vorsäule, PSS Größenausschluss-Säule, Dionex Kationenaustauscher-Säule, Interchim Umkehrphasen-Säule mit Vorsäule und Dionex Anionenaustauscher-Säule (mehr Details zu den verwendeten Trennsäulen in Abschnitt 6.1.2).....	8
Abb. 2-4 schematische Kalibrierkurve mit $V_P$ = Porenvolumen, $V_E$ = Elutionsvolumen, $V_0$ = Ausschlussvolumen und $V_t$ = Totvolumen; modifiziert nach Abb. 15.3 aus Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie [74] und der Symboldefinition des Arzneibuchkommentars zur Ausschlusschromatographie [73]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	12
Abb. 2-5 Chromatographische Kenngrößen in einem Beispielchromatogramm nach dem Europäischen Arzneibuch; modifiziert nach Abbildung 2.2.46-1 des Ph. Eur. 7.4, Grundwerk 2011; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint®; $t_M$ bzw. $V_M$ =Totzeit bzw. Totvolumen, $t_{R1}$ , $t_{R2}$ bzw. $V_{R1}$ , $V_{R2}$ = Retentionszeit bzw. Retentionsvolumen eines Analyten, $w_h$ =Peakhalbwertsbreite, $H$ =Peakhöhe, $H/2$ =halbe Peakhöhe .....	15
Abb. 2-6 einzelne Terme der van Deemter-Beziehung sowie die resultierende van Deemter-Kurve (rote durchgängige Linie); Eddy-Diffusion (graue gestrichelte Linie), Longitudinaldiffusion (dunkelblaue gepunktet und gestrichelte Linie), Massenübergang (blaue gestrichelte Linie); modifiziert nach Abbildung 2.7 aus [86]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	17
Abb. 2-7 Ermittlung der Peaksymmetrie nach dem Europäischen Arzneibuch; modifiziert nach Abbildung 2.2.46-5 des Ph. Eur. 7.4, Grundwerk 2011; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	18
Abb. 2-8 Ermittlung des Peak-Tal-Verhältnisses nach dem Europäischen Arzneibuch; modifiziert nach Abbildung 2.2.46-6 des Ph. Eur. 7.4, Grundwerk 2011; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	19
Abb. 2-9 Ermittlung des Signal-Rausch-Verhältnisses nach dem Europäischen Arzneibuch; modifiziert nach Abbildung 2.2.46-7 des Ph. Eur. 7.4, Grundwerk 2011; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	20
Abb. 2-10 allgemeine schematische Struktur einer $\alpha$ -Aminocarbonsäure, $\text{COO}^-$ =deprotonierte Carbonsäure, $\text{NH}_3^+$ =protonierte Aminogruppe, R=je nach Aminosäure anderer Rest; nach [94]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	21
Abb. 2-11 schematische Darstellung eines IgG1-Immunglobulins mit L=leichte Kette, H=schwere Kette, KH=Oligosaccharid, *=variable Domäne; modifiziert nach [105]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	23
Abb. 2-12 verwendetes TXRF-Gerät: S2 Picofox; Verwendung mit Erlaubnis der Bruker Nano GmbH .....	25



Abb. 2-13 schematischer Aufbau und Messprinzip eines TXRF-Spektrometers; 1) Röntgenröhre, 2) strahladaptierende Einheit, 3) Probenträger mit Probe, 4) Detektor, modifiziert nach [42] und [124]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	26
Abb. 2-14 schematische Entstehung der Röntgenfluoreszenz; 1) Anregung eines Atoms durch Röntgenstrahlung, 2) Ionisation eines Elektrons geringen Energieniveaus, 3) Auffüllen der entstandenen Fehlstelle mit einem Elektron höheren Energieniveaus, 4) Energiedifferenz wird in Form eines Röntgenquanten abgegeben (Röntgenfluoreszenz); modifiziert nach [126] und [127]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	27
Abb. 2-15 Quarzglas-Probenträger für TXRF-Messungen; Verwendung mit Erlaubnis der Bruker Nano GmbH.....	29
Abb. 2-16 verschiedene Präzisionsebenen; modifiziert nach [171]; erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® .....	34
Abb. 3-1 Repräsentatives Chromatogramm der Trennung von Myoglobin ( $t_R=0,323$ min) und $\beta$ -Casein ( $t_R=3,83$ min) mit je 1 mg/ml; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.1 ....	39
Abb. 3-2 Übereinander gelegte Chromatogramme bei unterschiedlichen Wellenlängen (siehe Legende) der Trennung von Myoglobin ( $t_R=0,227$ min), Ovalbumin ( $t_R=2,95$ min) und BSA ( $t_R=3,83$ min) in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,6 zur Identifizierung der besten Detektionswellenlänge; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2.....	40
Abb. 3-3 zeigt das aufgetretene „Ovalbuminproblem“ bei der Trennung von Myoglobin ( $t_R=0,293$ min), Ovalbumin ( $t_{R1}=0,427$ min, $t_{R2}=0,613$ min, $t_{R3}=0,907$ min, $t_{R4}=1,25$ , $t_{R5}=3,07$ min, $t_{R6}=3,41$ min und $t_{R7}=3,69$ min) und BSA ( $t_R=4,57$ min) in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,6; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2 .....	41
Abb. 3-4 Repräsentatives Chromatogramm der Trennung von Myoglobin ( $t_R=0,341$ min), Ovalbumin ( $t_R=2,78$ min) und BSA ( $t_R=3,81$ min) mit der entwickelten Methode in 20 mM Tris-HCl Puffer pH 8,6 und zugehörigem Blanklauf bei gleichen Bedingungen um den Anstieg der Basislinie durch die gradientenbedingte Chloridzunahme zu präsentieren; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2 .....	42
Abb. 3-5 zeigt die nötige Rechenoperation zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der entwickelten SAX-Methode zur Trennung von Myoglobin, Ovalbumin und BSA (Konzentration je 25 $\mu$ g /ml) bei der die UV-Rohdaten der Blankinjektion (hellgrau-gestrichelte Linie) von den UV-Rohdaten der Probe (schwarz-gestrichelte Linie) abgezogen werden müssen, sodass ein neues Chromatogramm (rote kontinuierliche Linie) entsteht, bei dem nun wieder deutliche Ovalbumin- und BSA-Peaks erkennbar sind; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2 .....	44
Abb. 3-6 Repräsentatives Chromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit SAX in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 mit einem Gradienten von 0 bis 5 % B in 30 min bei einer Flussrate von 1 ml/min und einem Injektionsvolumen von 40 $\mu$ l; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3 .....	46
Abb. 3-7 Repräsentatives Chromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit SAX in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 mit einem Gradienten von 0 bis 5 % B in 30 min; zur Entfernung stärker haftender Probenbestandteile wurde nach dreißig Minuten die Ionenstärke erhöht indem der Gradient bis 100 % B gefahren wurde mit anschließender Reequilibration zu Startkonditionen; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3.....	46

Abb. 3-8 Repräsentatives Chromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit SAX in 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7,0 mit einem Gradienten von 0 bis 5 % B in 30 min (rot) und ein Blank derselben Methode (schwarz gestrichelt); weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3.....	47
Abb. 3-9 Beispielchromatogramm der SAX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 mit einem Gradienten von 0-5 % B in 30 min; wie bei den zuvor beschriebenen Puffersystemen (siehe Abb. 3-7 und 3-8) wurde auch hier der Gradient bis 100 % Eluent B zur Säulenreinigung verwendet und anschließend zu Startkonditionen reequilibriert; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3 .....	48
Abb. 3-10 SEC-Trennung von Ovalbumin ( $t_R=9,52$ min) und Myoglobin ( $t_R=10,27$ min) im idealen Modus unter Verwendung der Säule BioSep™ s-3000 von Phenomenex; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.1 .....	49
Abb. 3-11 zeigt ein repräsentatives SEC-Chromatogramm im Idealen Modus der Trennung von Ovalbumin ( $t_R=10,6$ min) und Myoglobin ( $t_R=11,43$ min) mit der Säule Proteema 300 Å, 5 µm (300 x 8 mm, PSS) und einer Vorsäule (8 x 50 mm, PSS) aus [183].....	50
Abb. 3-12 Repräsentatives Chromatogramm der SEC-Trennung von Ovalbumin ( $t_R=8,64$ min) und Myoglobin ( $t_R=10,73$ min) im nicht-idealen Modus mit der Säule BioSep™ s-3000 von Phenomenex; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.2.....	51
Abb. 3-13 SEC-Trennung im nicht-idealen Modus von Ovalbumin ( $t_R=6,80$ min) und Myoglobin ( $t_R=12,08$ min) mit der Säule Proteema 300 Å, 5 µm (300 x 8 mm, PSS) und einer Vorsäule (8 x 50 mm, PSS) aus [183] .....	52
Abb. 3-14 Struktur von Brij 35 mit $n=23$ ; erstellt mit MDL ISIS Draw.....	54
Abb. 3-15 SEC-Trennung von Myoglobin (Peak 2) und Ovalbumin (Peak 1) im nicht-idealen Modus mit und ohne Brij-Zusatz .....	55
Abb. 3-16 Struktur von SDS; erstellt mit MDL ISIS Draw.....	55
Abb. 3-17 Beispielhafte SEC-Trennung im nicht-idealen Modus von Myoglobin und Ovalbumin mit Zusatz von 0,5 % SDS; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.3....	56
Abb. 3-18 Beispielchromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie von (2)=Monomer, (1)=Dimer und (3)=Fragment; mit Vergrößerung des Bereiches von 0 bis 15 Minuten: Peak eines Multimers bei 5,30 min erkennbar; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.4.....	60
Abb. 3-19 Kalibration der zur Antikörpertrennung verwendeten BioSep™ s-3000 Säule von Phenomenex; eingesetzt wurden hierfür Ovalbumin (45 kDa), BSA (66 kDa) und Natriumazid ( $\leq 5$ kDa); auf der x-Achse sind die Retentionszeiten der Einzelkomponenten der Antikörpertrennung aufgetragen, sodass deren Masse direkt an der y-Achse abgelesen werden kann; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.2.4 .....	61
Abb. 3-20 WCX-Analyse von BSA mit Auftrennung in zwei Peaks in 17 mM Phosphatpuffer pH 6,35; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.1 .....	63
Abb. 3-21 Repräsentatives WCX-Chromatogramm der Trennung von Myoglobin (Peak 2), Ovalbumin und BSA (gemeinsam Peak 1) in 17-18 mM Phosphatpuffer pH 6,35; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.1 .....	64
Abb. 3-22 Repräsentative WCX-Chromatogramme der Einzelmessungen der Modellproteine und einer Blankinjektion in 20 mM Phosphatpuffer pH 4,5 als Eluent A und Eluent B: Eluent	

A + 1 M Natriumchlorid übereinandergelegt; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.1 .....	65
Abb. 3-23 Repräsentatives Chromatogramm der WCX-Trennung von Myoglobin ( $t_R=4,08$ min) und Ovalbumin ( $t_{R1}=1,12$ min, $t_R=1,87$ min)) in 17-18 mM Phosphatpuffer pH 6,35 mit Vergrößerung des Bereiches von 0 bis 5 min; auffällig ist, dass der Peak nicht komplett detektiert werden konnte, da die Konzentration von Ovalbumin zu hoch ist; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.2 .....	67
Abb. 3-24 Repräsentative WCX-Trennung von Ovalbumin ( $t_R = 1,16$ min), Cytochrom C ( $t_R = 12,41$ min) und Lysoszym ( $t_R = 15,72$ min); experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.3 .....	68
Abb. 3-25 Repräsentatives Chromatogramm der Ausgangsmethode zur Antikörpertrennung mit Phosphatpuffer (Gradient: 4-70 % B in 30 min) nach Dionex Application note 125 [242] und Vergrößerung des markierten Bereiches wodurch nun Ansätze von drei Peaks erkennbar; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4 .....	70
Abb. 3-26 Beispielchromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit WCX in Phosphatpuffer pH 6,0; verändert wurde im Vergleich zur Ausgangsmethode (siehe Abb. 3-25) nur der Gradient auf 7-10 % B in 40 min, was eine deutlich bessere Auflösung zur Folge hat; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4 .....	71
Abb. 3-27 Vergleichschromatogramm einer Antikörpertrennung mit WCX unter Verwendung der gleichen Trennsäule; aus und modifiziert nach Dionex Application Note 127 [245] .....	72
Abb. 3-28 Eine weitere Verbesserung der Auflösung im Vergleich zu Abb. 3-25 und Abb. 3-26 zeigt dieses Beispielchromatogramm des Antikörpers bei Trennung mit WCX in Phosphatpuffer pH 6,0; es wurde zu dem neuen Gradienten (7-10 % B in 40 min) noch ein Flussratengradient von 0,25 bis 1 ml/min in 40 min ergänzend angewendet; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4 .....	73
Abb. 3-29 Beispielchromatogramm zur weiteren Optimierung der Auflösung durch Veränderung der Flussrate (0,50 ml/min ohne Gradient) bei der Antikörpertrennung mit WCX in Phosphatpuffer pH 6,0 dem neuen Gradienten (7-10 % B in 40 min); erkennbar ist hier allerdings, dass nach Ende des Gradienten bei 40 min noch eine Elution bei der Säulenreinigung mit höherer Salzkonzentration erfolgt; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4 .....	74
Abb. 3-30 Repräsentatives Chromatogramm der Ausgangsmethode zur Antikörpertrennung mit MES-Puffer (Gradient: 55-85 % B in 50 min) nach Dionex Anleitung für ProPac WCX-10 und SCX-10 [197] mit Vergrößerung des markierten Bereiches; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4 .....	75
Abb. 3-31 Beispielchromatogramm der Antikörpertrennung mit WCX in MES-Puffer mit dem optimierten Gradienten von 48-58 % B in 50 min; erkennbar ist hier die bessere Auflösung zwischen den drei Hauptpeaks (1: 12,79 min, 2: 18,71 min, 3: 29,41 min) aber auch das Rauschen im dritten Hauptpeak bei 29,41 min; experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 6.4.3.4 .....	76
Abb. 3-32 UV-Spektren aufgenommen von 200 bis 300 nm von MES-Puffer (20 mM MES+60 mM NaCl pH 5,5; schwarze Kurve) und Phosphatpuffer (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 6,0; rote Kurve) aus den beschriebenen Methoden 1 und 2; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4 .....	77

Abb. 3-33 Beispielchromatogramm der Antikörpertrennung mit dem schwachen Kationenaustauscher mit WCX; deutlich erkennbar ist die schwankende Basislinie mit negativen Absorptionswerten; die Elution der einzelnen Peaks erfolgte erst ganz am Ende des verwendeten Gradienten (0-35 % B in 35 min); der größte vermeintliche Peak bei 41 min ist bedingt durch die Reequilibration zu Startkonditionen; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4.....	78
Abb. 3-34 Repräsentatives Chromatogramm der WCX-Antikörpertrennung in Phosphatpuffer mit den identifizierten und noch zu klärenden Peaks .....	79
Abb. 3-35 Beispielchromatogramm der Antikörpertrennung mit WCX in MES-Puffer mit den identifizierten und noch zu klärenden Peaks .....	79
Abb. 3-36 Carboxypeptidase B; nach Universität Maine [252] .....	80
Abb. 3-37 Beispielchromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit WCX in Phosphatpuffer pH 6,0 ohne Zusatz als Blindprobe (rote gestrichelte Linie) mit den typischen drei Hauptpeaks und nach Zusatz des Enzyms Carboxypeptidase B (schwarze durchgängige Linie) mit nur noch einem Hauptpeak, jedoch mit deutlicher Zunahme der Peakfläche und den schematisch zugeordneten Formen des monoklonalen Antikörpers mit unterschiedlichen Lysinresten; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.5 .....	81
Abb. 3-38 Analog zu Abb. 3-37 ist hier ein Beispielchromatogramm der Trennung des monoklonalen Antikörpers mit WCX in MES-Puffer pH 5,5 dargestellt; ohne Enzymzusatz als Blindprobe (rote gestrichelte Linie) und nach Zusatz des Enzyms Carboxypeptidase B (schwarze durchgängige Linie) mit nur noch einem Hauptpeak und den schematisch zugeordneten Formen des monoklonalen Antikörpers mit unterschiedlichen Lysinresten; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.5 .....	82
Abb. 3-39 Kontrollkarten der Tag-zu-Tag Präzision (60 Läufe insgesamt an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 20 Läufen); oben links: mAb ohne Lysinrest, oben rechts: mAb mit einem Lysinrest, unten: mAb mit zwei Lysinresten .....	84
Abb. 3-40 Repräsentative RP-Trennung von Myoglobin ( $t_{R1} = 17,69$ min, $t_{R2} = 20,01$ min), Ovalbumin ( $t_{R1} = 10,55$ min, $t_{R2} = 24,90$ min) und BSA ( $t_R = 13,49$ min) mit Säule Uptisphere® 300 Å C4, 5 µm (150 x 4,6 mm, Interchim); Flussrate: 0,5 ml/min, Eluenten: A) 5 % ACN : 95 % Wasser + 0,1 % TFA, B) 95 % ACN : 5 % Wasser + 0,1 % TFA, Gradient: linear von 85-0 % B in 26 min; Detektion: UV – 214 nm, Injektionsvolumen: 50 µl [218].....	87
Abb. 3-41 Blankinjektion RP mit deutlich erkennbarem chemischen Rauschen; experimentelle Bedingungen siehe Abb. 3-40 und [218] .....	89
Abb. 3-42 Blankinjektion Proteintrennung SAX mit deutlichem Anstieg der Basislinie auf Grund der steigenden Chloridkonzentration durch den eingesetzten Gradienten; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.2 .....	90
Abb. 3-43 Blankinjektion Proteintrennung WCX mit Anstieg der Basislinie mit anschließendem Abfall auf Grund der Reequilibration der Säule; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.3 .....	90
Abb. 3-44 Blankinjektion mAb-Trennung WCX mit Phosphatpuffer, Gradient 7-10 % B; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4, Methode 1 .....	94
Abb. 3-45 Blankinjektion mAb-Trennung WCX mit MES-Puffer, Gradient 48-58 % B; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4, Methode 2 .....	94

Abb. 3-46 Blankinjektion mAb-Trennung SAX in Tris-HCl-Puffer pH 7,0; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.1.3 .....	95
Abb. 4-1 Strukturformel Auranofin, erstellt mit Microsoft™ PowerPoint® nach [287] .....	101
Abb. 4-2 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 10 sec Analysenzeit; log y-Achse.....	103
Abb. 4-3 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 250 sec Analysenzeit; log y-Achse.....	104
Abb. 4-4 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 1000 sec Analysenzeit; log y-Achse.....	105
Abb. 4-5 TXRF-Spektrum von Gold-Standardlösung (250 ppb) ohne PVA-Zusatz, L $\alpha$ Au: 9,7 keV, L $\beta$ Au: 11,4 keV; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.4.3.....	106
Abb. 4-6 TXRF-Spektrum von Gold-Standardlösung (250 ppb) mit 0,4 % PVA (Endkonzentration), L $\alpha$ Au: 9,7 keV, L $\beta$ Au: 11,4 keV; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.4.3.....	107
Abb. 4-7 Versuchsdesign zur Präzisionsbestimmung von Gold-Standardlösung mit und ohne PVA-Zugabe.....	108
Abb. 7-1 Kontrollkarte der Tag-zu-Tag Präzision der Peakflächen der Trennung von Myoglobin und Ovalbumin mit der Säule BioSep™ s-3000 von Phenomenex im Modus der nicht-idealen SEC.....	129
Abb. 7-2 SEC-Trennung von Myoglobin (Peak 2) und Ovalbumin (Peak 1) im idealen Modus mit und ohne Brij-Zusatz .....	129
Abb. 7-3 Kontrollkarte der Tag-zu-Tag Präzision der Retentionszeiten der SEC-Messungen des monoklonalen Antikörpers.....	130
Abb. 7-4 Kontrollkarte der Tag-zu-Tag Präzision der Peakflächen des Dimers der SEC-Messungen des monoklonalen Antikörpers.....	130
Abb. 7-5 Kontrollkarte der Tag-zu-Tag Präzision der Peakflächen des Fragments der SEC-Messungen des monoklonalen Antikörpers.....	131
Abb. 7-6 Schema zur Untersuchung unterschiedlicher Einflussfaktoren auf Präzision und Wiederfindungsrate .....	131
Abb. 7-7 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 10 sec Analysenzeit .	132
Abb. 7-8 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 250 sec Analysenzeit	132
Abb. 7-9 Repräsentatives Spektrum von Auranofin (10 ppm Au) mit 1000 sec Analysenzeit .....	133
Abb. 7-10 TXRF-Spektrum von 25 ppb Gold-Standardlösung mit 0,4 % PVA, Analysenzeit 250 sec.....	133

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1 Stationäre Phasen mit zugehörigem Trennprinzip für die HPLC-Analytik von Proteinen und Peptiden modifiziert nach [65] und [66] .....	10
Tab. 2-2 eingesetzte Proteine mit Eigenschaften.....	22
Tab. 3-1 Präzisionsdaten der Peakflächen und Bestimmungsgrenze (LOQ) der einzelnen Proteine mit der entwickelten SAX-Methode (Genaueres zur Ermittlung der LOQ in Abschnitt 3.1.3.2) .....	43
Tab. 3-2 Übersicht über getestete Parameter während der Methodenentwicklung der SAX-Trennung des monoklonalen Antikörpers; die hervorgehobenen Parameter waren die Vielversprechendsten.....	45
Tab. 3-3 Ergebnisse der Präzisionsmessungen der Peakflächen der SEC-Trennung von Myoglobin und Ovalbumin mit der Säule BioSep <sup>TM</sup> s-3000 von Phenomenex.....	53
Tab. 3-4 Präzisionsdaten der Peakflächen der Trennung von Myoglobin und Ovalbumin mit der Säule Proteema 300 Å, 5 µm von PSS aus [183] .....	53
Tab. 3-5 Datenstruktur der von der PHAST GmbH zur Verfügung gestellten SEC-Daten einer Proteinreinheitsprüfung .....	57
Tab. 3-6 Datenstruktur der von der A&M STABTEST GmbH zur Verfügung gestellten SEC-Daten einer Antikörperanalyse.....	57
Tab. 3-7 Präzision der SEC-Industriedaten der Firmen PHAST GmbH und A&M STABTEST GmbH .....	57
Tab. 3-8 Datenstruktur der von der PHAST GmbH zur Verfügung gestellten RP-Daten mit Diodenarray-Detektion .....	58
Tab. 3-9 Datenstruktur der von der PHAST GmbH zur Verfügung gestellten RP-Daten mit Fluoreszenz-Detektion .....	58
Tab. 3-10 Präzision der RP-Industriedaten der Firma PHAST GmbH mit Diodenarray- und Fluoreszenz-Detektion .....	59
Tab. 3-11 Präzisionsdaten der Retentionszeiten und Peakflächen der Einzelkomponenten sowie der Gesamtfläche der SEC-Trennung des monoklonalen Antikörpers .....	62
Tab. 3-12 Präzisionsdaten der Peakflächen und ermittelte Bestimmungsgrenze (LOQ) der Proteintrennung mit dem schwachen Kationenaustauscher .....	69
Tab. 3-13 Getestete Ausgangsmethoden während der Methodenentwicklung für den monoklonalen Antikörper mit WCX; weitere experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.3.4 .....	70
Tab. 3-14 Präzisionsdaten der Retentionszeiten und der Gesamtfläche der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,0; Gradient 7-10 % B mit einer Flussrate von 1 ml/min; siehe Abb. 3-26 .....	84
Tab. 3-15 Präzisionsdaten der Retentionszeiten und der Gesamtfläche der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in Phosphatpuffer pH 6,0; Gradient 7-10 % B mit einer Flussrate von 1 ml/min nach Standardisierung; siehe Abb. 3-26.....	85

Tab. 3-16 Daten der Wiederholpräzision der Retentionszeiten und der Gesamtfläche der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in Phosphatpuffer pH 6,0; Gradient 7-10 % B mit einer Flussrate von 0,5 ml/min vor und nach Standardisierung; siehe Abb. 3-29 .....	86
Tab. 3-17 Daten der Wiederholpräzision der Retentionszeiten und der Gesamtfläche der WCX-Trennung des monoklonalen Antikörpers in MES-Puffer pH 5,5; Gradient 48-58 % B mit einer Flussrate von 1 ml/min vor und nach Standardisierung; siehe Abb. 3-31 .....	86
Tab. 3-18 Präzisionsdaten der Peakflächen und Bestimmungsgrenze der RP-Messungen der Modellproteine [218].....	87
Tab. 3-19 Vergleich der unterschiedlichen Trennmodi basierend auf den zuvor vorgestellten Methoden zur Proteintrennung bezüglich verschiedener Parameter der Methodenbewertung .....	92
Tab. 3-20 Vergleich der unterschiedlichen Trennmodi basierend auf den zuvor vorgestellten Methoden zur Antikörpertrennung bezüglich der bisher getesteten Parameter der Methodenbewertung.....	96
Tab. 4-1 Präzision der Messungen von Auranofin (10 ppm Au) bei unterschiedlicher Analysenzeit und Rotation der Probenträger im Gerät und weiterer Variationen in der Probenvorbereitung; die eingeklammerten Werte sind Einzelerien, die der Komplettheit halber erwähnt werden sollen; experimentelle Bedingungen in Abschnitt 6.4.4.2 .....	102
Tab. 4-2 Ergebnisse der Präzisionsmessungen von Gold-Standardlösung (500 ppb Au) mit und ohne PVA nach dem in Abb. 4-7 präsentierten Schema.....	108
Tab. 4-3 S/N-Verhältnisse und Präzision für Gold-Standardlösung bei unterschiedlichen Konzentrationen jeweils mit und ohne PVA-Zugabe zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze; jede Probe wurde auf drei Discs aufgetragen und jeweils 10-mal für 250 sec vermessen .....	109
Tab. 6-1 Aufbau des MERCK® Hitachi® HPLC Systems .....	115
Tab. 6-2 Aufbau des ersten VWR-Hitachi® HPLC Systems .....	115
Tab. 6-3 Aufbau des zweiten VWR.-Hitachi® HPLC Systems.....	115
Tab. 6-4 eingesetzte Modellproteine .....	118
Tab. 6-5 Reagenzien und Chemikalien der einzelnen Projekte .....	119

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Sandra Grotefend
Geburtsdatum	30.01.1985
Geburtsort	Peine
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Beruflicher Werdegang

seit Mai 2013	Apothekerin in der Stern-Apotheke im Ärztezentrum in Peine
Mai 2010 – April 2013	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut f. Med. u. Pharm. Chemie der Technischen Universität Braunschweig bei Prof. Dr. Hermann Wätzig
Juni 2010	Approbation als Apothekerin
November 2009 – April 2010	zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung TU Braunschweig, Institut für Pharm. Chemie
Mai 2009 – Oktober 2009	erster Abschnitt der praktischen Ausbildung Stern-Apotheke im Ärztezentrum in Peine

### Studium

Oktober 2004 – April 2009	Pharmaziestudium an der TU Braunschweig
---------------------------	---

### Schulbildung

1997 – 2004	Gymnasium am Silberkamp, Peine (Abitur)
1995 – 1997	Orientierungsstufe am Schlossberg, Peine
1991 – 1995	Grundschule Vöhrum